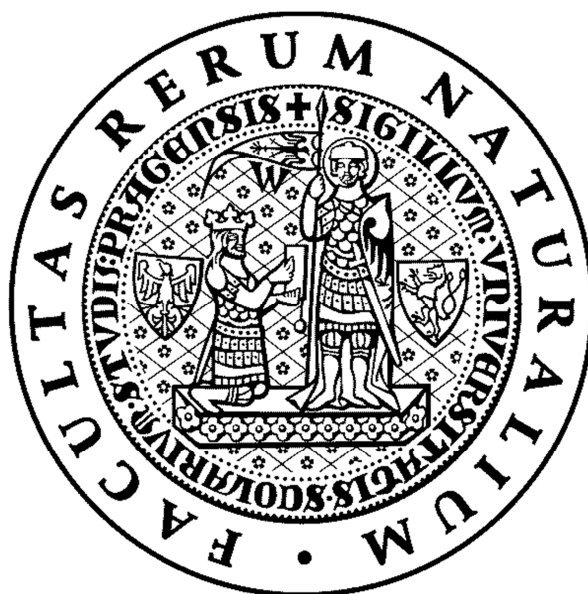


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Alan Kádek

Proteomická charakterizace membránových
mikrodomén lidských NK buněk

Proteomic characterization of human
NK cell membrane microdomains

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Petr Man, PhD.

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Alan Kádek

Poděkování

Na tomto místě bych především rád poděkoval svému školiteli RNDr. Petru Manovi, PhD. za vedení této práce, rady a pomoc při jejím vypracovávání a konstruktivní kritiku při jejím psaní.

Dále děkuji zejména RNDr. Petru Novákovi, PhD. a ostatním členům Laboratoře charakterizace molekulární struktury AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji též prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za umožnění práce v Laboratoři architektury proteinů AV ČR; MUDr. Anně Fišerové, CSc. za pomoc s kultivacemi buněk; doc. RNDr. Petru Dráberovi, DrSc. za umožnění práce na kamerovém systému LAS-3000; RNDr. Šárce Růžickové za umožnění práce na separátoru RoboSep; RNDr. Janu Svobodovi a Mgr. Žanetě Růžickové za provedení cytometrických měření; p. Romanu Liškovi za provedení ozařování buněčných kultur a personálu transfuzního oddělení Thomayerovy nemocnice za poskytování experimentálního materiálu.

Závěrem patří velký dík mým rodičům a nejbližším za všestrannou podporu.

ABSTRAKT

Proteomická charakterizace membránových mikrodomén lidských NK buněk.

Bc. Alan Kádek

*(Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta,
Univerzita Karlova v Praze, Česká republika)*

Přirozené zabíječské (NK) buňky jsou důležitou součástí neadaptivního imunitního systému. Uplatňují se zejména v boji proti nádorovým, virově infikovaným či jinak malformovaným buňkám. Plasmatická membrána NK buněk obsahuje oblasti se specifickým lipidovým složením v porovnání s okolní membránou (tzv. membránové mikrodomény či rafty). Mikrodomény jsou díky odlišné lipidové stavbě místem preferenčního výskytu některých imunologicky zajímavých proteinů a hrají roli v procesech buněčné polarizace a signalizace. Charakteristickou vlastností membránových mikrodomén je částečná rezistence vůči solubilizaci mírnými neionogenními detergenty.

V této práci byly v rámci detergentu-rezistentní membránové frakce (DRM) izolovány mikrodomény z lidské buněčné linie NK-92MI a z NK buněk získaných imunomagnetickou separací z periferní krve neleukemických dárců. K izolaci byly využity detergenty Triton X-100 nebo Brij-98 a ultracentrifugace v sacharosovém gradientu. Proteinové složení izolovaných DRM bylo analyzováno hmotnostní spektrometrií metodou LC-MALDI-TOF/TOF. Seznamy identifikovaných proteinů z těchto analýz vykazují některé zajímavé vlastnosti týkající se proteinového složení DRM za různých podmínek solubilizace a měly by najít své uplatnění při výběru kandidátních proteinů pro funkční studie.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie (MS), membránové rafty, NK buňky.

ABSTRACT

Proteomic characterization of human NK cell membrane microdomains. (in Czech)

Bc. Alan Kádek

*(Department of Biochemistry, Faculty of Science,
Charles University in Prague, Czech Republic)*

Natural killer (NK) cells are one of the important components of innate immune system. Their main function is to fight against tumors, virally infected or otherwise malformed cells. Plasma membranes of NK cells contain regions with specific lipid composition compared to the surrounding membrane (called membrane microdomains or rafts). Because of their lipid composition, microdomains preferentially accommodate some immunologically relevant proteins and play a role during cellular polarization and signalization. Characteristic feature of membrane microdomains is their partial resistance to solubilization by mild non-ionogenic detergents.

In this thesis, microdomains were isolated in a detergent-resistant membrane fraction (DRM) from human NK-92MI cell line and from NK cells immunomagnetically enriched from peripheral blood of non-leukemic donors. For the isolation, Triton X-100 or Brij-98 detergent solubilization and ultracentrifugation in a sucrose density gradient was used. Protein composition of isolated DRMs was analyzed by mass spectrometry employing an LC-MALDI-TOF/TOF method. Protein lists generated in these analyses show some interesting features concerning protein composition of DRMs under different solubilization conditions and should find their use when considering potential candidate proteins for functional studies.

Keywords: mass spectrometry (MS), membrane rafts, NK cells.

OBSAH

OBSAH.....	5
SEZNAM ZKRATEK	7
1. Úvod.....	10
1.1. Imunitní systém.....	10
1.1.1. Buňky imunitního systému	10
1.2. Přirozené zabíječské (NK) buňky	12
1.2.1. Funkce NK buněk v organismu	13
1.2.2. Rozpoznávací mechanismy NK buněk	14
1.2.3. Cytotoxicita NK buněk	16
1.2.4. NK buněčná imunoterapie	17
1.2.5. Kultivace, expanse a izolace NK buněk	17
1.3. Membránové mikrodomény.....	21
1.3.1. Historie poznání struktury biologických membrán	21
1.3.2. Složení biologických membrán	22
1.3.3. Kaveoly a membránové mikrodomény.....	24
1.3.4. Dynamika membránových mikrodomén a buněčná signalizace.....	26
1.3.5. Izolace detergentu-rezistentních membrán (DRM) a membránové rafty	28
1.4. Proteomika a hmotnostní spektrometrie	29
1.4.1. Konstrukce hmotnostního spektrometru	30
1.4.2. Hmotnostně spektrometrická identifikace proteinů.....	33
1.4.3. Identifikace složitých směsí proteinů	35
1.4.4. Automatická bottom-up MS/MS identifikace proteinů	35
1.4.5. Problém odvození proteinů („protein inference“)	38
1.4.6. Nezávislá statistická validace výsledků identifikace	38
2. Cíle práce	40
3. Experimentální část.....	41
3.1. Seznam použitého materiálu a přístrojů.....	41
3.1.1. Přístroje a pomůcky	41
3.1.2. Chemikálie	43
3.1.3. Bioreagencie	45
3.1.4. Média	45
3.1.5. Pufry a solventy	46
3.1.6. Biologický materiál.....	48
3.1.7. Programové vybavení	48
3.2. Experimentální metody	49
3.2.1. Kultivace buněčných linií	49
3.2.2. Izolace mononukleárních buněk z lidské periferní krve (PBMC)	50
3.2.3. Expansní protokoly pro NK buňky	51
3.2.4. Imunomagnetická izolace NK buněk z PBMC.....	51
3.2.5. Průtoková cytometrie	52
3.2.6. Izolace detergent-rezistentních membránových mikrodomén (DRM)	53
3.2.7. SDS-PAGE (diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforesa v prostředí SDS).....	54
3.2.8. Elektropřenos a imunodetekce proteinů	55
3.2.9. Chemické a enzymatické štěpení proteinů.....	56
3.2.10. Příprava peptidových vzorků pro hmotnostní spektrometrii	57
3.2.11. MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie	58
3.2.12. LC-MALDI-TOF/TOF hmotnostní spektrometrie	58

3.2.13. Automatizovaná interpretace kolizních hmotnostních spekter	61
4. Výsledky	62
4.1. Kultivace NK buněk	62
4.1.1. Kultivace linie NK-92MI.....	62
4.1.2. Expansní protokoly pro NK buňky z lidské periferní krve.....	63
4.1.3. Izolace NK buněk z lidské periferní krve	65
4.2. Klasická proteomická analýza DRM	67
4.2.1. Polyakrylamidová gelová elektroforesa.....	67
4.2.2. Elektropřenos a imunodetekce proteinů	68
4.3. Hmotnostně spektrometrická proteomická analýza DRM.....	70
4.3.1. Odstranění detergentu, sacharosy a solí ze vzorků	70
4.3.2. MALDI-TOF analýza peptidového složení štěpených frakcí gradientu.....	72
4.3.3. Technika LC-MALDI-TOF/TOF	73
4.3.4. Identifikace MS/MS fragmentových spekter.....	75
4.3.5. Identifikace proteinů ve vzorku	76
5. Diskuse.....	82
6. Závěr	87
LITERATURA	88

SEZNAM ZKRATEK

+MS2	pozitivní MS/MS mód
ACN	acetonitril
AcOH	kyselina octová
ACTH	adenokortikotropní hormon (adenocorticotrophic hormone)
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)
APS	peroxodisíran amonný
ATCC	Americká typová sbírka buněčných kultur (American Type Culture Collection)
BCR	receptor B lymfocytů (B-cell receptor)
bisakrylamid	N,N'-methylen-bis-akrylamid
B _{mem}	paměťové (memory) B lymfocyty
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
BTÚ AV ČR	Biotechnologický ústav Akademie věd České republiky, v.v.i.
CBB-R250	Coomassie Brilliant Blue – R250
CCD	elektronický kamerový snímač (charged-coupled device)
CD	diferenční antigenová skupina (cluster of differentiation)
CEM	cholesterolem nabohacené membrány (cholesterol-enriched membranes)
CID (též CAD)	kolizi indukovaná / aktivovaná disociace (collision induced /activated dissociation)
DHB	kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
DIG	detergentem nerozpustné glykosfingolipidy nabohacené membrány (detergent-insoluble glycosphingolipid enriched membranes)
DMEM	Dulbeccem modifikované Eaglovo médium (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	dimethylsulfoxid
DRM	detergentu-rezistentní membrány (detergent-resistant membranes)
E _{acc}	urychlovací potenciální energie
EBV	virus Epstein-Barrové (Epstein-Barr virus)
ECD / ETD	disociace záchytem / přenosem elektronu (electron-capture / electron-transfer dissociation)
ECL	chemiluminiscenční substrát pro elektropřenos (enhanced chemiluminescence substrate)
EDTA	N,N,N',N'-ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)
E _k	kinetická energie
ER	endoplasmatické retikulum
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
Et ₂ O	diethylether
EtOH	ethanol
FA	kyselina mravenčí (formic acid)
FACS	průtoková cytometrie (fluorescence-activated cell sorting)
Fas-L / -R	ligand / receptor (CD95) stimulující apoptosu (apoptosis stimulating fragment)
FBS	fetální telecí sérum (foetal bovine serum)
Fc	fragment molekuly protilátky (crystallizable fragment)
FcγRIII	nízkoafinitní receptor pro Fc část molekuly protilátky izotypu IgG
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie (fluorescence correlation spectroscopy)
FDR	procento falešně pozitivních identifikací (false discovery ratio)
FRAP	metoda obnovy fluorescence po fotovybělení (fluorescence recovery after photobleaching)
FRET	Försterův rezonanční přenos energie (Förster's resonance energy transfer)
FSC	přímý rozptyl světla (forward scatter)
FT-ICR	detektor/analyzátor s iontovou cyklotronovou rezonancí a Fourierovou transformací (Fourier transform ion cyclotron resonance)
FT-MS	hmotnostní spektrometrie s Fourierovou transformací (Fourier transform mass spectrometry) – zahrnuje hmotnostní spektrometry typu FT-ICR i FT-OT
FT-OT	detektor/analyzátor typu Orbitrap s Fourierovou transformací (Fourier transform Orbitrap)
G	Gauge (mezinárodní stupnice definující vnitřní i vnější průměry injekční jehly)
GA	Golgiho aparát

GAM-HRP	kozí protilátka proti myší protilátce konjugovaná s křenovou peroxidasou (goat-anti-mouse antibody – horseradish peroxidase)
GEM	glykosfingolipidy nabohacené membrány (glycosphingolipid-enriched membranes)
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
GlcNAc	N-acetylglukosamin
G _{M3}	gangliosid M3
GM-CSF	granulocytární makrofágový kolonie stimulující faktor (granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
GPI	glykosylfosfatidylinositolová kotva (glycosylphosphatidylinositol anchor)
Gy	Gray (jednotka absorbované radiační dávky ionizujícího záření)
HCCA	kyselina p-hydroxy- α -kyanoskořicová (cyanohydroxycinnamic acid)
HEPES	2-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-ethansulfonová kyselina
HLA	lidský leukocytární antigen (human leukocyte antigen)
HRP	křenová peroxidasa (horseradish peroxidase)
HS	koňské sérum (horse serum)
ID	identifikace
IFN γ	interferon- γ
IgG / M	imunoglobulin isotypu G / M
IL	interleukin
Inos	myo-inositol
iPrOH	isopropanol
IR	infračervené světlo (infrared light)
IRMPD	infračervená multifotonová disociace (infrared multi-photon dissociation)
IS	imunitní systém
ISD	rozpad v iontovém zdroji (in-source decay)
IT	iontová past (ion trap)
ITAM	tyrosinový aktivační receptorový motiv (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
ITIM	tyrosinový inhibiční receptorový motiv (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)
IU	mezinárodní jednotka množství látky dle její biologické aktivity (international unit)
K562	lidská buněčná linie chronické myeloidní leukemie
K562-mb15-41BBL	buněčná linie K562 transdukováná geny pro IL-15 a 41BB ligand
LAK	lymfokiny aktivované zabíjácké buňky (lymphokine activated killer)
LC-MALDI	kapalinová chromatografie ve spojení s MALDI
LC-MS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LIFT	hmotnostně spektrometrická technika dodatečného urychlení iontů
MACS	technika magnetické separace buněk (magnetic cell sorting)
MALDI	desorpce/ionizace laserem za přítomnosti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization)
MALDI-TOF/TOF	tandemová hmotnostní spektrometrie doby letu s MALDI desorpce/ionizací analytu
Man	manosa
MBÚ AV ČR	Mikrobiologický ústav Akademie věd ČR, v.v.i.
MEM	Eaglovo minimální esenciální médium (Eagle's minimal essential medium)
MeOH	methanol
MHC gp	glykoprotein hlavního histokompatibilitního komplexu (major histocompatibility complex glycoprotein)
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MudPIT	technika identifikace proteinů na základě vícerozměrné separace (multidimensional protein identification technique)
NCRs	receptory přirozené cytotoxicity (natural cytotoxicity receptors)

Nd:YAG	yttrium aluminium granát dopovaný atomy neodymu (neodymium-doped yttrium aluminium garnet)
NK	přirozené zabíječské buňky (natural killer cells)
NK-92	lidská buněčná lymfoblastomová linie nesoucí fenotyp NK buněk
NK-92MI	buněčná linie NK-92, stabilně trasfekovaná genem pro IL-2 (mitogen independent)
NKAES	kultivační systém aktivující a expandující NK buňky (NK activating and expanding system)
NKT	lymfocyty nesoucí povrchové znaky NK buněk i T buněčný receptor
PA	kyselina fosfatidová (phosphatidic acid)
PBMC	mononukleární buňky z periferní krve (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	solný roztok pufovaný fosforečnany (phosphate buffered saline)
PC	fosfatidylcholin (phosphatidylcholine)
PE	fosfatidylethanolamin (phosphatidylethanolamine)
PE-Cy7	konjugovaný fluorochrom sestávající z fykoerithrinu (PE) a cyaninu 7 (Cy7)
PG	fosfatidylglycerol (phosphatidylglycerol)
PI	fosfatidylinositol (phosphatidylinositol)
PMF	technika peptidového hmotnostního mapování (peptide mass fingerprinting)
PS	fosfatidylserin (phosphatidylserine)
PSD	rozpad za iontovým zdrojem (post-source decay)
PTFE	polytetrafluorethylen (Teflon)
QqQ	MS analyzátor v uspořádání trojitěho kvadrupólu (též TSQ)
qTOF	hybridní MS analyzátor v uspořádání kvadrupólu s analyzátozem doby letu
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
RPMI-1640	tkáňové kultivační médium s uhličitánem (Roswell Park Memorial Institute medium)
RPMI-8866	lidská B-lymfoblastomová buněčná linie
RTG	rentgen
S/N	odstup signálu od šumu (signal-to-noise ratio)
SC	pokrytí sekvence proteinu (sequence coverage)
SCGM	médium pro kultivaci kmenových buněk (stem cell growth medium)
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecylsulphate)
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforesa v prostředí SDS (polyacrylamide gel electrophoresis)
SPM	sřingomyelin (sphingomyeline)
SSC	stranový rozptyl světla (side scatter)
TBS	solný roztok pufovaný Tris (Tris-buffered saline)
TBS-T	TBS s 0,05% detergentem Tween-20
T _c	cytotoxické (cytotoxic) T lymfocyty
TCR	receptor T lymfocytů (T-cell receptor)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TERT	telomerasová reverzní transkriptasa (telomerase reverse transcriptase)
TFA	kyselina trifluoroctová (trifluoroacetic acid)
TGS	Tris-glycin-SDS pufr
T _h	pomocné (helper) T lymfocyty
TIFF	Tritonem nerozpustná flotující frakce (Triton-insoluble floating fraction)
TIM	Tritonem nerozpustné membrány (Triton-insoluble membranes)
TM	transmembránový
T _{mem}	paměťový (memory) T lymfocyt
TNE	Tris-NaCl-EDTA pufr
TOF	MS analyzátor doby letu (time-of-flight analyzer)
TRAIL	TNF příbuzný ligand spouštějící apoptosu (TNF-related apoptosis-inducing ligand)
TRAIL-R	buněčný receptor ligandu TRAIL
T _{reg}	regulační (regulatory) T lymfocyty
TSQ	MS analyzátor v uspořádání trojitěho kvadrupólu (triple-stage quadrupole, též QqQ)
ÚMG AV ČR	Ústav molekulární genetiky Akademie věd ČR, v.v.i.
UV	ultrafialové světlo (ultraviolet light)

1. ÚVOD

1.1. Imunitní systém

Imunitní systém (IS) je aparát, v určité formě přítomný u veškerých mnohobuněčných živočichů (říše *Metazoa*).^{/1/} Jeho úlohou je zajištění homeostázy organismu, tj. stálosti vnitřního prostředí, z pohledu ochrany před škodlivinami, které mohou být jak vnějšího (exogenního), tak vnitřního (endogenního) původu.^{/2/} Imunitní systém rozpoznává a likviduje cizorodé škodlivé faktory a současně dohlíží na buňky vlastní organismu, které v případě, že jsou staré, mutované či jinak poškozené, taktéž odstraňuje. Činnost IS ovšem nesmí příliš poškozovat vlastní organismus a proto je nutné, aby byl schopen rozpoznat a tolerovat zdravé buňky organismu.^{/2/} Je patrné, že uvedené základní funkce (obranyschopnost a tolerance) si vzájemně odporují, tudíž je nezbytné, aby byl IS jako celek dobře vyvážen a jeho činnost koordinována. Imunitní systém je složen z mnoha komponent, které se doplňují, případně jsou do určité míry redundantní.^{/1/}

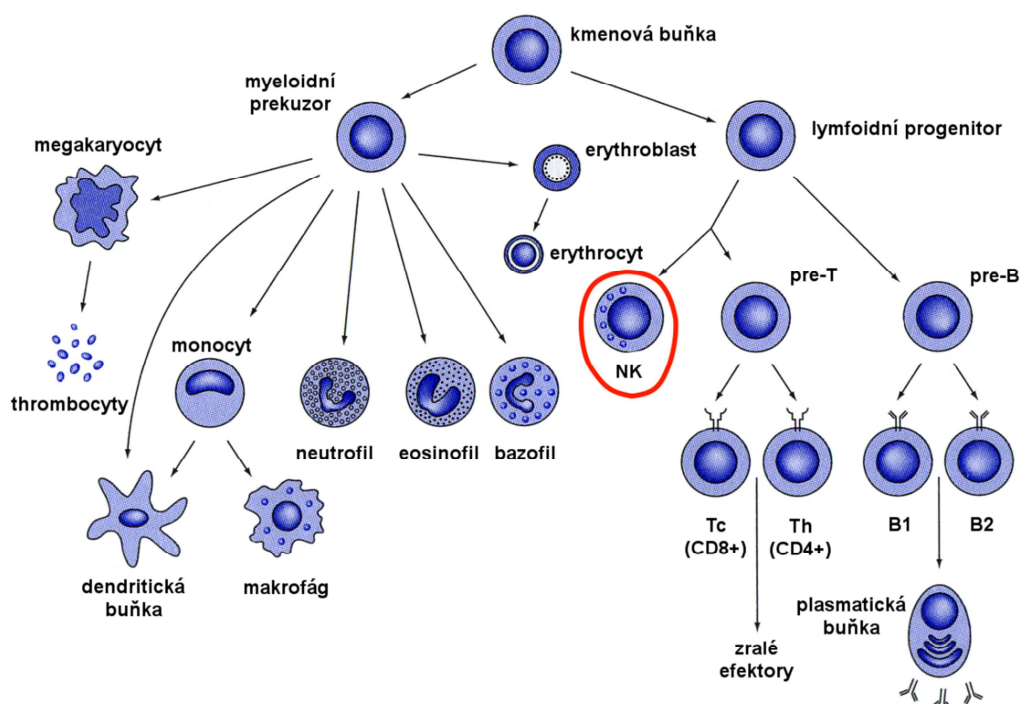
Mechanismy působení imunitního systému se dělí do dvou kategorií. Antigenně specifické (adaptivní) mechanismy jsou vývojově mladší (vyskytují se až u obratlovců) a jsou založeny na tvorbě a selekci vysoce specifických molekulárních struktur (antigenně specifické receptory T lymfocytů, protilátky tvořené B lymfocyty).^{/1,2/} Selektace probíhá relativně pomalu až po kontaktu s antigenní strukturou a buňky sekretující či nesoucí selektovanou specifickou molekulu jsou následně klonálně amplifikovány.^{/1/} Oproti nespecifickým imunitním mechanismům zahrnuje specifická imunita i imunologickou paměť – tj. IS je schopen si „pamatovat“ předchozí setkání s určitým antigenem a při jeho opětovném výskytu reagovat podstatně rychleji.^{/2/} Antigenně nespecifické (vrozené) imunitní mechanismy jsou z evolučního hlediska starší a více rozšířené.^{/2/} Jednotlivé komponenty nespecifické imunity (zejména komplement, interferony, NK – „přirozené zabíječské“ buňky a fagocytyující buňky) jsou oproti vysoce specifickým mechanismům adaptivní imunity cíleny při rozpoznávání hrozeb obecněji, ale reagují podstatně rychleji, jelikož jsou v organismu připravené již před kontaktem s antigenem.^{/2/} Oba druhy imunitních mechanismů využívají jak humorálních (látkových), tak buněčných komponent.

1.1.1. Buňky imunitního systému

Buněčná složka imunitního systému zahrnuje samostatné imunitní buňky (imunocyty) a lymfatické tkáně a orgány, tvořené imunocyty společně s pojivovými buňkami.^{/2/} Primárními lymfatickými tkáněmi a orgány jsou kostní dřen, thymus a u ptáků Fabriciova

burza. Na těchto místech vznikají, diferencují se a vyzrávají imunitní buňky. Sekundární lymfatické orgány a tkáně jsou místa, na kterých dochází k řízenému styku antigen prezentujících buněk (APC) s nematurovanými (naivními) T lymfocyty a volných antigenů s B lymfocyty.^{/2/} Lymfocyty jsou dle reaktivity vůči danému antigenu selektovány a reaktivní buňky klonálně amplifikovány. Mezi sekundární lymfatické orgány patří slezina, lymfatické uzliny, střevní Peyerovy pláty či tonzily (mandle).^{/2/} Jako rozptýlená sekundární lymfatická tkáň jsou označovány sliznice.^{/2/} Imunocyty nesdružené do vyšších funkčních a anatomických celků, které kolují organismem v krvi a lymfě, jsou označovány jako bílé krvinky (leukocyty).

Leukocyty vznikají průběžně po celý život organismu v kostní dřeni z pluripotentních kmenových buněk a dále se diferencují a specializují pod vlivem mnoha faktorů.^{/2/} Dvěma základními liniemi diferenciace leukocytů z kmenových buněk jsou linie myeloidní a linie lymfoidní (Obr. 1). Myeloidní linií vznikají makrofágy a eosinofilní, basofilní a neutrofilní granulocyty. Všechny tyto buňky mají schopnost fagocytózy, produkce cytokinů a jiných mediátorů imunitního systému a podílí se na nespecifické imunitní obraně organismu.^{/2/} Dále jsou součástí této linie dendritické buňky, jejichž hlavní funkcí je (společně s monocyty a makrofágy) prezentace antigenu naivním T lymfocytům při antigenně specifické selekci reaktivních klonů.^{/2/} Myeloidního původu jsou mimo leukocytů též



Obr. 1: Diferenční linie hematopoetických buněk. Buňky lymfoidní linie i myeloidní linie vycházejí ze společné prekurzorové pluripotentní kmenové buňky v kostní dřeni a v průběhu svého vývoje se dále postupně diferencují a specializují. V lymfoidní linii diferenciace jsou označeny NK (přirozené zabíječské) buňky. Převzato a upraveno z /2/.

červené krvinky (erythrocyty), jejichž hlavní funkcí je transport kyslíku v krvi, a krevní destičky (thrombocyty), které se zejména podílejí na reakcích krevní koagulační kaskády.

Druhou diferenciační linií leukocytů je linie lymfoidní, do které patří buňky adaptivní imunity – B lymfocyty a plasmatické buňky (finální diferenciační stádium B buněk produkující protilátky) a T lymfocyty, které v organismu hrají více rolí. Cytotoxické $CD8^+$ T_c lymfocyty jsou efektorové buňky adaptivní imunity, schopné eliminace nežádoucích buněk sekrecí cytotoxických enzymů (perforinu a granzymů).^{/2/} Pomocné $CD4^+$ T_h lymfocyty se účastní produkce cytokinů a také přímé kostimulace aktivace makrofágů a B lymfocytů.^{/2/} Regulační $CD4^+$ T_{reg} lymfocyty jsou takové lymfocyty, které sice nesou autoreaktivní T buněčný receptor (TCR), ale místo napadání vlastních tkání se podílí na supresi autoimunitních reakcí.^{/2/} Některé lymfocyty (T_{mem} a B_{mem}) též tvoří imunologickou paměť organismu. Posledními typy buněk, které se diferencují v rámci lymfoidní linie jsou NK buňky a (pravděpodobně regulační) NKT buňky (nesoucí kromě povrchových markerů NK buněk též T buněčný receptor typu TCR- $\alpha\beta$).^{/2/} Na rozdíl od T a B buněk se NK buňky účastní imunity nespecifické.

1.2. Přírozené zabíječské (NK) buňky

Schopnost některých lymfocytů působit cytotoxicky na buňky transplantátu byla popsána již v roce 1960.^{/3/} Následně byla takováto reaktivita pozorována i u jiných imunitních reakcí, kdy kromě buněk transplantátu byly napadány i virově infikované buňky či buňky nádorové.^{/3/} Bylo zjištěno, že buňkami způsobujícími tuto cytotoxickou imunitní odpověď jsou efektorové T_c lymfocyty, které rozpoznávají antigeny prezentované pomocí MHC glykoproteinů na povrchu zabíjených buněk.^{/3/} Histokompatibilitní komplexy MHC (major histocompatibility complex), které se u člověka nazývají HLA (human leukocyte antigen), umožňují imunitnímu systému rozpoznání vlastních buněk organismu, stejně jako dohled nad jejich stavem. MHC glykoproteiny třídy II jsou proteinové komplexy exprimované na antigen prezentujících buňkách (APC), které jejich pomocí prezentují na svém povrchu (glyko)peptidové či v určitých případech i lipidové (u „neklasických“ MHC skupiny CD1) fragmenty pohlcené buňkou.^{/2/} Prezentované antigeny jsou vystaveny tak, aby mohly být rozpoznány T lymfocytárním receptorem, přes který poskytnou lymfocytu aktivační signál. MHC glykoproteiny třídy I jsou oproti třídě II za fyziologických podmínek exprimovány na všech jaderných buňkách organismu.^{/2/} Na svém povrchu prezentují kratší peptidové fragmenty z proteinů, které jsou přítomné

v buňce.^{/2/} To umožňuje T lymfocytům, aby rozpoznaly buňku, která byla napadena intracelulárním parazitem a produkuje abnormální proteiny. Velký polymorfismus MHC glykoproteinů (zejména třídy I) je také imunitním systémem využíván pro rozpoznání buněk pocházejících z jiného organismu^{/2/}, jelikož dva jedinci, ač stejného biologického druhu, exprimují většinou odlišnou kombinaci isoform MHC proteinů (MHC haplotyp).

Cytotoxicita T_c lymfocytů je, jak bylo popsáno výše, vázána na přítomnost MHC komplexů na cílových buňkách (MHC-restricted cytotoxicity). Je ovšem také známo, že nádorové buňky^{/4/} či buňky po infekci některými viry^{/5,6/} se vyhýbají kontrole adaptivního imunitního systému snížením exprese MHC komplexů a tím i snížením povrchové prezentace svých antigenů imunitnímu systému. Kromě MHC-dependentních T_c lymfocytů byly v druhé polovině 70. letech 20. století popsány též lymfocyty, které vykazovaly cytotoxicitu i bez přítomnosti MHC glykoproteinů na cílových buňkách (non-MHC-restricted cytotoxicity) a to navíc bez předchozí sensitizace vůči cílovým buňkám a proliferace.^{/2,3/} Tento druh cytotoxicity byl pojmenován jako „přirozené zabíjení“ a buňky zprostředkovávající tuto imunitní reakci byly na základě své funkce označeny jako „přirozené zabíječské buňky“ – NK buňky (z anglického natural killer cells).^{/3/} Až v roce 1988 bylo dosaženo konsenzu ohledně klasifikace NK buněk a tyto byly u lidí definovány jako samostatná subpopulace velkých granulárních lymfocytů, s fenotypem povrchových markerů CD56(Leu-19, NKH-1)⁺ / CD16(FcγRIII)⁺ / CD3(TCR koreceptor)⁻, které jsou schopny zprostředkovat cytolytické reakce i přes absenci MHC gp I či II na cílové buňce.^{/3/} NK buňky byly dále charakterizovány jako buňky neklonálního původu, které za fyziologických okolností tvoří cca 5 – 20 % mononukleárních buněk v periferní krvi.^{/3,7/}

1.2.1. Funkce NK buněk v organismu

V organismu zajišťují NK buňky zejména zmíněnou imunitní obranu před virově, nádorově či stresově pozměněnými buňkami, ale také produkci lymfokinů (jako antivirového a antimikrobiálního IFN-γ, či dělení a diferenciaci stimulujícího IL-3 a GM-CSF).^{/2,7,8/} Produkované lymfokiny se uplatňují při regulační funkci NK buněk, kdy ovlivňují aktivaci makrofágů, diferenciaci T_h buněk a hematopoesu.^{/2,7/}

Již v roce 1986 bylo zjištěno, že NK buňky nejsou zcela homogenní populací.^{/9/} Postupně bylo taktéž objeveno, že zmíněné cytotoxické a regulační funkce mohou být vysledovány k rozdílným NK buněčným subpopulacím, lišícím se expresí povrchových antigenů CD56 a CD16.^{/10/} Subpopulace NK buněk mající vyšší cytotoxické účinky a

současně čítající asi 90 % NK buněk v krvi je fenotypově popsána jako CD56^{dim} (nízká povrchová exprese) / CD16^{bright} (vysoká povrchová exprese) / CD3⁻.^{/9,10/} Naopak subpopulace buněk s menší cytotoxicitou, ale větší produkcí lymfokinových regulačních mediátorů, která zahrnuje zbylých asi 10 % krevních NK buněk, je CD56^{bright} / CD16^{dim/-} / CD3⁻.^{/9,10/} Zmíněné subpopulace NK buněk se liší i mírou exprese dalších povrchových molekul, jako jsou různé chemokinové receptory (CCR7, receptory rodiny CXCR či podjednotky receptoru pro IL-2), adhesivní molekuly (jako L-selektin, CD44 či CD49) nebo NK receptory (KIR či heterodimer CD94/NKG2A).^{/10/} Subpopulace jsou též morfologicky odlišné množstvím obsažených cytoplasmatických granulí (obsahujících cytotoxické enzymy). CD56^{dim} buňky ve shodě se svojí vyšší cytotoxickou kapacitou obsahují oproti CD56^{bright} buňkám více granulí.^{/9,10/} V roce 2007 byla publikována práce ukazující, že regulační CD56^{bright} NK buňky po kontaktu s fibroblasty diferencují na cytotoxické CD56^{dim} buňky.^{/11/} Toto pozorování naznačuje, že se nemusí jednat o subpopulace vzniklé z rozdílných diferenciačních drah, jak bylo dříve uvažováno, ale cytotoxické NK buňky mohou maturovat a diferenciovat se *in vivo* z regulačních NK buněk po jejich stimulaci v periferních tkáních.^{/11/}

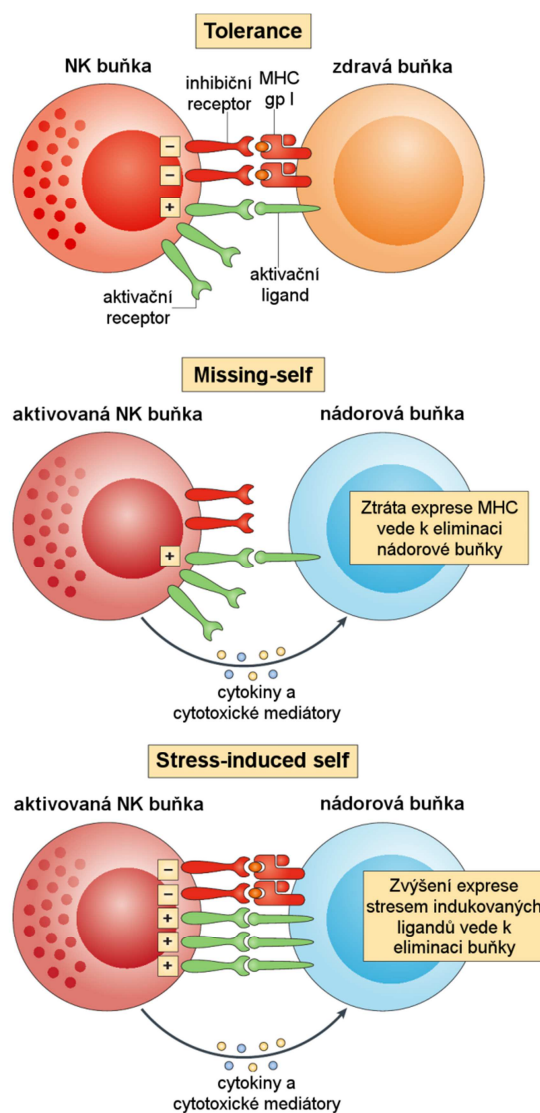
1.2.2. Rozpoznávací mechanismy NK buněk

Aby mohly cytotoxické NK buňky účinně eliminovat virově či nádorově malformované nebo jinak stresované buňky, je nutné, aby je byly schopny odlišit od zdravých buněk vlastního organismu. K tomuto účelu NK buňky využívají systém MHC (u člověka nazývaných HLA) glykoproteinů (viz část 1.1.2 této práce), ovšem jiným způsobem než cytotoxické T_c lymfocyty. Na rozdíl od antigenně specifických T a B lymfocytů nemají NK buňky jediný receptor typu TCR či BCR, který by rozpoznával antigeny vázané na MHC gp I (TCR) či volně kolující v krvi či míze (BCR) a aktivoval efektorové funkce buňky. Místo takového receptoru mají NK buňky řadu různých aktivačních a inhibičních receptorů, které jsou na jejich povrchu exprimovány současně.^{/2,7/} Aktivace či inhibice cytotoxických efektorových mechanismů NK buněk je řízena poměrem aktivačních a inhibičních signálů, které od svých receptorů NK buňka obdrží.^{/7/}

Inhibiční receptory NK buněk rozpoznávají zejména MHC (HLA) antigeny vlastní buňkám organismu a poskytují NK buňce signál tlumící její cytotoxicitu. Je známo mnoho inhibičních receptorů, jejichž společným znakem je výskyt strukturních motivů ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif – s konsenzus sekvencí V/IxYxxV/L, kde x je libovolná aminokyselina) v jejich cytoplasmatické doméně.^{/7,12/} Běžnými

inhibičními receptory NK buněk jsou KLRG1, heterodimer CD94-NKG2A, NKR-P1 (CD161), proteiny rodiny KIR a LIR u lidí či Ly49 u myší.^{/7,12,13/} Oproti tomu aktivační receptory na povrchu NK buněk rozpoznávají struktury stimulačních ligandů na povrchu zdravých vlastních i virově/nádorově transformovaných buněk.^{/2,7,12,14/} Aktivační receptory NK buněk obvykle asociují s adaptorovými proteiny, které ve své intracelulární doméně nesou strukturní motivy ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif – s konsenzus sekvencí YxxL/I, kde x je jakákoli aminokyselina)^{/7/}, či v některých případech i jiné aktivační motivy.^{/15/} Mezi známé aktivační receptory NK buněk patří proteiny NKp30, NKp44 a NKp46, souhrnně označované jako receptory přirozené cytotoxicity (NCRs – natural cytotoxicity receptors), heterodimery CD94-NKG2C/D/E, receptor CD16 či CD44.^{/7,13/}

Pokud dojde k virové infekci či nádorové transformaci buňky, může u ní dojít ke ztrátě či snížení exprese MHC gp třídy I, čímž se virus či nádor snaží vyhnout imunitní kontrole T lymfocytů. V takovémto případě nejsou aktivační signály od stimulačních ligandů přítomných na buňce (dostatečně) tlumeny inhibičními signály, NK buňka aktivuje své cytotoxické mechanismy a cílovou buňku zlikviduje.^{/7,12,14/} Tuto takzvanou „missing-self“ rozpoznávací teorii znázorňuje obrázek (Obr. 2). Druhá tzv. „(stress)-induced-self“ rozpoznávací teorie (Obr. 2) vysvětluje, jak dochází k eliminaci infikovaných či nádorově transformovaných buněk, pokud u nich nedojde ke snížení exprese MHC gp I.^{/12,14/} Tlumivé signály od inhibičních NK receptorů jsou stále přítomné, ale jsou převážené silnými aktivačními signály v důsledku vysoké



Obr. 2: Modely regulace cytotoxicity NK buněk. Ztráta exprese MHC gp, stejně jako zvýšená exprese aktivačních ligandů na malformovaných buňkách vede u NK buňky k porušení rovnováhy aktivačních a inhibičních signálů a aktivaci cytotoxické odpovědi. Převzato a upraveno z /14/.

exprese stimulačních antigenů na cílové buňce. Stimulačními antigeny v tomto případě mohou být jak povrchové struktury typické pro virus / nádor, tak molekuly, které jsou oproti klidovému stavu ve zvýšené míře exprimovány na cílové buňce v důsledku prodělaného stresu.^{/14/}

Zajímavou a unikátní cestou aktivace NK buňky je též stimulace receptoru CD16 (FcγRIIIa), který je nízkoafinitním receptorem pro Fc fragmenty protilátek typu IgG.^{/3,7/} NK buňky jsou skrze stimulaci tohoto aktivačního receptoru bez kostimulace dalšími receptory schopny zabíjet buňky opsonizované příslušnými protilátkami.^{/3,7/} Tato forma eliminace nežádoucích buněk se nazývá buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC – antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity).^{/7/}

1.2.3. Cytotoxicita NK buněk

Mechanismy, kterými NK buňky zabíjejí cílové buňky, jsou obdobné mechanismům využívaným cytotoxickými T_c lymfocyty.^{/7/} Jedná se primárně o exocytické vylití granulí obsahujících cytotoxické enzymy perforin a granzymy A a B do imunologické synapse vytvořené mezi NK buňkou a cílovou buňkou.^{/16/} Oproti T_c lymfocytům, které tvoří cytotoxické granule až po aktivaci, jsou granule s cytotoxickými enzymy u NK buněk připravené již před kontaktem s cílovou buňkou.^{/16/} Přesný mechanismus funkce perforin / granzymového systému není doposud znám. Původní model funkce těchto lytických enzymů předpokládal, že perforin tvoří po agregaci na cílové membráně pór, díky kterému ztrácí cílová buňka membránovou integritu a schopnost homeostázy.^{/17/} S objevem granzymů byl model upraven tak, že perforinovým pórem vstupují do cytoplasmy cílové buňky granzymy, které zde spouští apoptosu buňky.^{/16,17/} Dle posledních modelů je nejpravděpodobnější, že vstup granzymů do buňky je umožněn jejich endocytosou v membránovém váčku poté, co se granzymy, obsahující mnoho kladně nabitých aminokyselinových skupin, v komplexu s perforiny elektrostaticky asociují s membránou.^{/16,17/} Perforiny pravděpodobně slouží pro disrupci endosomů a uvolnění granzymů do cytoplasmy.^{/16/} V cytoplasmě cílové buňky granzymy A a B spouští apoptotickou kaskádu. Oba granzymy jsou serinové proteasy s odlišnou specifitou, které ve výsledku štěpí různé buněčné proteiny včetně kaspas, laminů, histonů, tubulinu či proteinů podílejících se na opravách DNA.^{/16/} Granzym B je též schopen spustit na přímém štěpení kaspas nezávislou apoptotickou dráhu štěpení proteinu BID, což ve výsledku vede k permeabilizaci vnitřní mitochondriální membrány, uvolnění cytochromu c do cytoplasmy a spuštění kaspasové apoptotické dráhy cestou assemblace apoptosomu.^{/16/}

Kromě spuštění apoptosy cílové buňky pomocí perforin / granzymové dráhy jsou NK buňky vybaveny i mechanismy indukce apoptosy expresí povrchových ligandů. NK buňky jsou po stimulaci CD16 Fc γ receptoru schopny zvýšit povrchovou expresi molekuly Fas-L.^{/18/} Fas-L je ligandem receptoru buněčné apoptotické smrti Fas-R (CD95 / Apo-1), který se vyskytuje na povrchu většiny buněk.^{/18/} Jeho aktivací dochází u cílové buňky ke spuštění programované apoptotické smrti. Navíc bylo zjištěno, že indukce Fas-L na povrchu NK buňky vede časem k autokrinní signalizaci a spuštění apoptosy samotné NK buňky.^{/18/} Tento efekt je pravděpodobně mechanismem potlačujícím přehnanou reaktivitu NK buněk a potenciální autoimunitní reakce. Obdobnou funkci jako Fas ligand-receptorový pár má i molekula TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) exprimovaná na povrchu aktivovaných NK buněk a její receptory TRAIL-R1 a 2.^{/19/} Oproti exocytose cytotoxických granulí probíhá zabíjení cílových buněk pomocí indukce ligandů Fas-L a TRAIL pomaleji (v řádu hodin v porovnání s cca 20 minutami u granulí)^{/18/}, jelikož exprese těchto ligandů je stejně jako produkce IFN- γ aktivujícího makrofágy aktivována na úrovni genové exprese.

1.2.4. NK buněčná imunoterapie

Svou schopností eliminace nádorově transformovaných buněk jsou NK buňky zajímavými kandidáty pro experimentální imunoterapie.^{/13,20/} Imunoterapie mohou spočívat v *in vivo* aktivaci a stimulaci NK buněk pacienta či v terapeutickém podání NK buněk aktivovaných případně i expandovaných *ex vivo*.^{/13/} Buněčná *ex vivo* imunoterapie může být autologní, allogenní či může využívat zavedené buněčné linie. Při autologní imunoterapii jsou pacientovi odebrané NK buňky aktivovány, expandovány a následně jsou mu zpětně injikovány. Allogenní imunoterapie naproti tomu využívá aktivované (a expandované) NK buňky od jiného dárce majícího stejný HLA haplotyp. Možností je také terapie podáním aktivovaných NK buněk pocházejících ze zavedené buněčné linie, u kterých ovšem musí před podáním být znemožněno buněčné dělení.^{/13/} Pro imunoterapeutické, stejně jako pro některé výzkumné aplikace je nutné získat velká množství čistých NK buněk.

1.2.5. Kultivace, expanse a izolace NK buněk

Jednou z možných cest získání velkých množství NK buněk je kultivace „nesmrtelných“ buněčných linií. Maligní lymfomické bujení postihující NK buňky je relativně vzácnou chorobou, ale přesto existuje několik zavedených linií NK buněčného

fenotypu.^{/21/} Pravých původních linií, které splňují fenotypové parametry maturovaných NK buněk (viz Tab. 1), je prozatím nejspíše pouze šest – HANK1, KHYG-1, NK-92, NKL, NK-YS a YT.^{/21/} Nejstarší linií je NK-YT, odvozená v roce 1983, která je jako jediná ze zmíněných linií nezávislá na IL-2.^{/21,22/} Ostatní linie, odvozené mezi lety 1992 – 1997, jsou při svých cytotoxických funkcích i při proliferaci na přítomnosti IL-2 závislé.^{/21/} Z buněčné linie NK-92 byla v roce 1999 vytvořena geneticky modifikovaná linie NK-92MI, stabilně transfekovaná genem pro syntézu lidského IL-2.^{/23/} Tato modifikace je zejména výhodná při adoptivních imunoterapiích, kdy pro zachování aktivity NK-92MI buněk není třeba pacientovi podávat velká množství interleukinu, který by měl na organismus toxické účinky.^{/23/} NK buněčné linie se snadno kultivují a ve vhodných podmínkách dobře expandují, nicméně ze své podstaty jsou maligními lymfomatičtými buňkami, což kromě prokázaných markantních změn v genotypu^{/21/} může mít vliv i na jejich fenotyp a funkci. Příkladem budiž fakt, že zavedené NK buněčné linie jsou oproti klasické fenotypické definici NK buněk (viz části 1.2 a 1.2.1 této práce) CD16⁻ a cytotoxicita typu ADCC u nich taktéž není vždy průkazná^{/21/} (Tab. 1). Tyto fenotypické a funkční vlastnosti naznačují u NK buněk maligního liniového původu podobnost s regulační (v periferní krvi minoritní) NK subpopulací.

Další možnou cestou je *ex vivo* expanse a kultivace NK buněk z krve pacientů s leukemií či zdravých dárců.^{/24,25/} Aktivace a expanse NK buněk se provádí buď na malém množství CD56⁺ / CD3⁻ selektovaných NK buněk nebo přímo na směsi mononukleárních buněk z periferní krve (PBMC). Proliferace NK buněk může být stimulována kultivací

Tab. 1: Parametry NK buněčných linií.

Parametr linie	Pravá NK buněčná linie
Původ:	NK buněčná malignance
Imortalizace:	+
Monoklonalita:	+
Geny TCR:	v nepřeskupené konfiguraci
Morfologie:	velké buňky s azurofilními granulemi
Imunofenotyp:	CD1 ⁻ , CD2 ⁺ , sCD3 ⁻ , cyCD3 ⁺ , CD4 ⁻ , CD5 ⁻ , CD7 ⁺ , CD8 ⁻ , CD16 ⁻ , CD56 ⁺ , CD57 ⁻ , TCRαβ ⁻ , TCRγδ ⁻
Karyotyp:	četné numerické i strukturní aberace
NK aktivita:	+
ADCC:	+/-
EBV:	+/-

Pozn.: Fenotypické a genotypické parametry definující pravou NK buněčnou linii. sCD3 – sekretovaná forma, cyCD3 – cytoplasmická forma, EBV – infekce virem Epstein-Barrové. Oproti fenotypické definici NK buňky jsou všechny NK linie CD16⁻. Zpracováno dle /21/.

v médiu s cytokiny jako jsou IL-2, IL-4, IL-7, IL-12 či IL-15.^{/25/} Nejúčinnějším stimulantem NK buněk se ukázal aktivátor cytotoxicity IL-2, ale proliferace buněk je samotným účinkem IL-2 zdá se pouze krátkodobá.^{/25,26/} Alici *et al.* a Guven *et. al.* též publikovali práce, ve kterých pro expansi lidských NK (a NKT) buněk z onkologických pacientů použili pre-kultivaci s anti-CD3 protilátkou (OKT-3) a IL-2, následovanou kultivací pouze s IL-2 v bezsérovém médiu pro kmenové buňky CellGro SCGM.^{/24,27/} Od roku 2008 je též dostupný komerční imunomagnetický kit firmy Miltenyi pro aktivaci a expansi lidských NK buněk, založený na stimulaci buněk pomocí anti-CD335 (NKp46) a anti-CD2 protilátek vázaných na magnetické mikrokuličky.^{/28/} Stimulace expanse pomocí cytokinů je obtížná a velmi citlivá na podmínky kultivace, přičemž výťažnost NK buněk není nejvyšší. Navíc při stimulaci PBMC pomocí IL-2 primárně expandují polyklonální aktivované T lymfocyty jako tzv. LAK (lymphokine-activated killer) buňky.^{/25/}

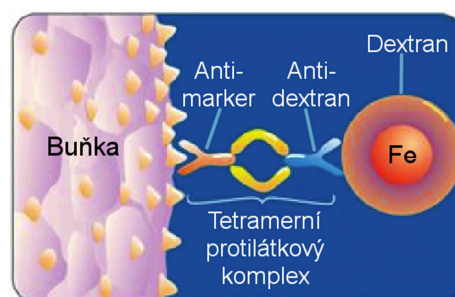
Ačkoli pomocí stimulace samotnými cytokiny lze dosáhnout určité expanse NK buněčné populace, většina publikovaných expansních protokolů využívá pro stimulaci NK buněk kokultivaci s jinými buňkami. Úkolem těchto doplňkových buněk je poskytnout NK buňkám částečně stimulovaným cytokiny další kostimulační signály ve formě produkovaných cytokinů a zejména přímého buněčného kontaktu.^{/25,29/} Pro tuto kostimulaci se osvědčily PBMC buňky, monocyty, buňky B-lymfoblastomu, dendritické buňky či nádorové buňky.^{/25,29,30/} Z nádorových buněk byla využita kokultivace PBMC či separovaných NK buněk s cílovými nádorovými buňkami, jako jsou lidská B-lymfoblastomová linie RPMI-8866^{/31/} či lidská linie chronické myeloidní leukemie K562^{/25/}. Z nádorové linie K562 byla též odvozena geneticky modifikovaná buněčná linie K562-mb15-41BBL, která byla transdukována genem pro „membránově vázaný“ chimerický IL-15 (cytokin důležitý pro přežití a expansi NK buněk^{/32,33/}) na transmembránové doméně CD8α, genem pro NK buňky aktivující povrchový ligand 41BBL a genem pro GFP jako markerem pro selekci transdukovaného klonu.^{/34/} Expansní systém, využívající kokultivaci PBMC či separovaných NK buněk s linií K562-mb15-41BBL byl autory nazván NKAES (NK activating and expanding system) a z údajů dostupných v literatuře má udávaný nejvyšší potenciál expanse NK buněk ve srovnání s ostatními metodami.^{/20,34/}

NK buňky, ať již liniového původu či získané expansí z krve dárce, je též možno geneticky manipulovat tak, aby se usnadnila jejich další proliferace a aktivace či se zvýšila efektivita jejich cytotoxického působení. Byla takto provedena například transdukce různých linií NK buněk genem pro syntézu IL-2^{/23,35/}, genem zajišťujícím zvýšenou expresi

telomerasové reversní transkriptasy (TERT)^{/36/} či chimerickým proteinem anti-CD19 spojeným s CD3 ζ ^{/34/}.

Jinou alternativu získávání čisté populace NK buněk skýtá jejich separace z periferní krve dárců. Pro získání menších množství čistých NK buněk lze využít třídění buněk metodou FACS (fluorescence-activated cell sorting) na základě značení buněk fluorescenčními protilátkami proti povrchovým markerům.^{/37/} Nicméně, tato metoda není kvůli své časové náročnosti a relativně malému množství zpracovaných buněk vhodná pro rozsáhlejší separace. Navíc oproti imunomagnetické separaci (MACS – magnetic cell sorting) jsou buňky v mikrofluidním systému FACS separátoru vystaveny stresujícímu působení hydrodynamických sil, které mohou ovlivnit viabilitu buněk či jejich fyziologii.^{/38/} Pro větší množství zpracovávaných buněk je tedy vhodnější imunomagnetická separace buněk, která je oproti FACS separaci založena na protilátkách imobilizovaných na mikroskopické feromagnetické kuličky. Buňky s povrchovým markerem rozpoznávaným protilátkou jsou spolu s kuličkou zadrženy v poli silného permanentního magnetu, zatímco suspenze obsahující buňky nenesoucí marker rozpoznávaný danou protilátkou (směsí protilátek) je odebrána. V případě pozitivní selekce je použita protilátka proti markeru požadované buněčné populace, v případě negativní selekce je použita směs protilátek proti markerům nežádoucích buněčných populací. Negativní selekce NK buněk má oproti pozitivní selekci menší výtěžnost buněk, ale je k separovaným buňkám šetrnější a způsobuje u nich minimální aktivaci (dle exprese časného aktivačního markeru CD69).^{/39/}

Komerčně dostupný kit pro negativní selekci lidských NK buněk EasySep je založen na směsi bispecifických tetramerních protilátkových komplexů proti nežádoucím buňkám přítomným v lidské periferní krvi.^{/40/} Tato směs sestává z protilátek proti lidským povrchovým antigenům CD3 (T lymfocyty, subset thymocytů), CD4 (subset T lymfocytů a thymocytů, monocyty, makrofágy), CD19 (B lymfocyty, folikulární dendritické buňky), CD20 (B lymfocyty, subset T lymfocytů), CD36 (thrombocyty, monocyty, makrofágy, erythrocyty, endoteliální b.), CD66b (granulocyty), CD123 (subset lymfocytů, basofily, progenitorové b., makrofágy, megakaryocyty, dendritické b.), HLA-DR (APC, aktivované T lymfocyty)



Obr. 3: Imunomagnetická selekce. Buňka je pomocí protilátek navázána na dextranem pokrytou železnou mikrokuličku a separována v magnetickém poli. Převzato a upraveno z /40/.

a glykoforinu (erythrocyty).^{/40,41/} Protilátka rozpoznávající buněčný antigen je dvojicí spojovacích protilátek vázána k protilátce, která rozpoznává dextran, jímž jsou pokryty feromagnetické mikrokuličky EasySep, přidané do suspenze po inkubaci protilátek s buňkami (viz Obr. 3, str. 20).^{/40/}

1.3. Membránové mikrodomény

1.3.1. Historie poznání struktury biologických membrán

Biologická membrána je buněčným kompartmentem, který prostorově definuje buňku či subcelulární organelu, odděluje ji od okolního prostředí, ale zároveň jí dovoluje interagovat s okolním prostředím a do určité (částečně regulovatelné) míry s ním i vyměňovat látky.

Struktura a organizace biologických membrán byla relativně dlouhou dobu málo prozkoumanou oblastí. Průkopnická práce Gorter a Grendela v roce 1925 postulovala model buněčné membrány jako uspořádané lipidové dvojvrstvy.^{/42/} Tento model, principiálně uznávaný dodnes, byl až v roce 1972 modifikován Singerem a Nicolsonem, kteří definovali tzv. „membránovou strukturu fluidní mozaiky“.^{/43,44/} V tomto přiblížení byla biologická membrána popsána jako fluidní dvojvrstva fosfolipidové matrice, ve které jsou amfipaticky (nepolární částí makromolekuly uvnitř hydrofobní lipidové části membrány, polární částí makromolekuly vně membrány ve vodném prostředí) zanořeny integrační membránové proteiny.^{/44/} Jednotlivé proteiny i fosfolipidy mohou volně difundovat v rámci dvojvrstvy, což přirozeně vede k míšení a náhodné organizaci jednotlivých komponent membrány a vzniku homogenní fosfolipidové dvojvrstvy.^{/44/} V případě proteinů byla též uvažována možnost jejich interakce a tvorby proteinových komplexů či shluků v membráně.^{/44/} Již v době publikace této práce se ovšem začalo ukazovat, že homogenní model rozložení proteinů a lipidů není ideální. Bylo zjištěno, že membránové lipidy nejsou zcela homogenně rozloženy a byly navrženy úpravy Singerova a Nicolsonova modelu, které by zahrnovaly přítomnost kvazikrystalických lipidových klastrů či oblastí lipidů ve více uspořádaném stavu.^{/43/} V roce 1982 Karnovsky *et al.* prezentoval koncept membránových lipidových domén na základě pozorování, že v biologické membráně existují lipidové fáze s různou fluiditou, které jsou schopné segregace.^{/45/} Taktéž bylo pozorováno, že segregace lipidových fází v membráně je závislá na složení směsi lipidů tvořících membránu a že významnou roli při organizaci lipidových fází hrají membránové steroly jako je cholesterol.^{/45/}

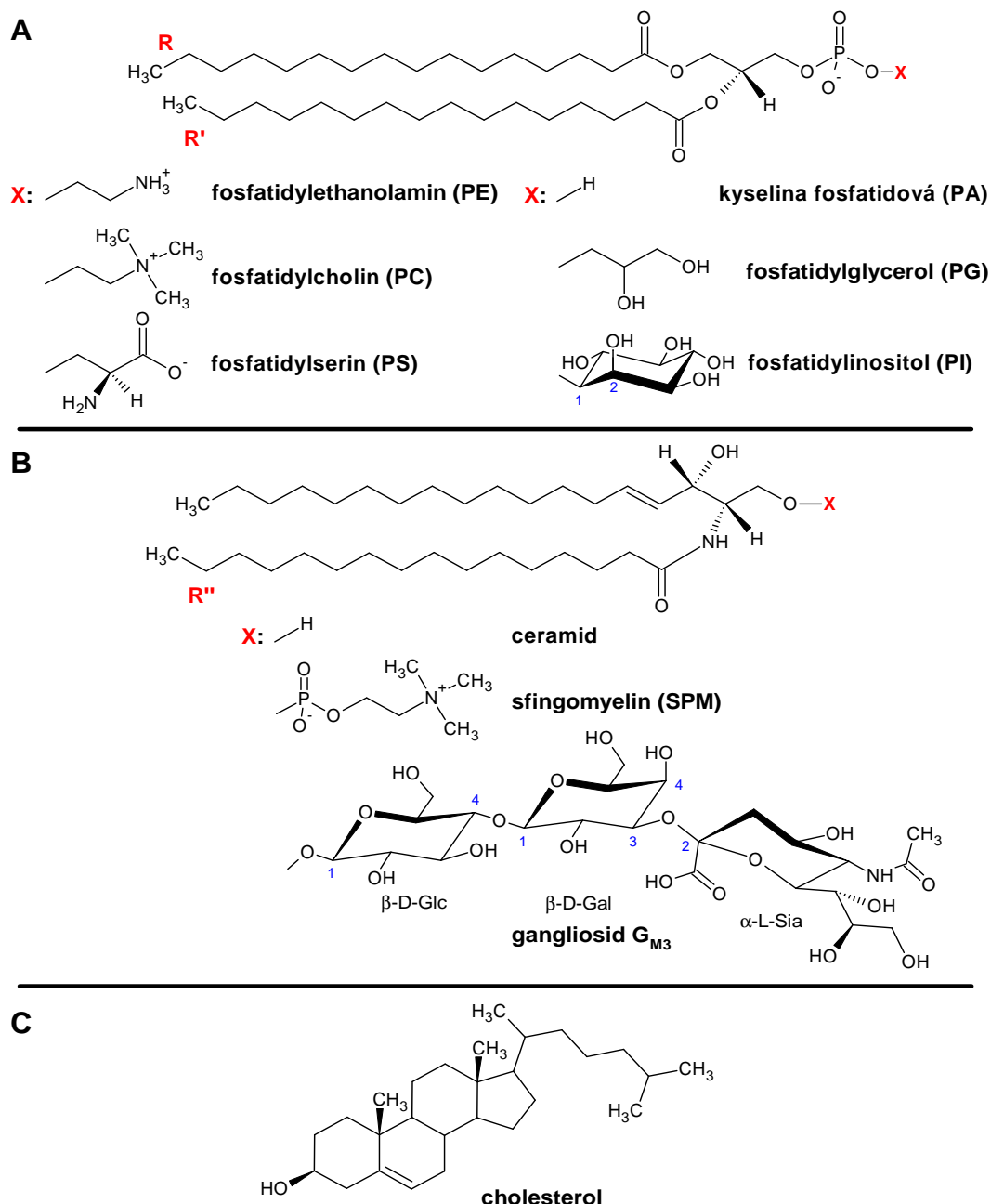
Klíčovým, pro současný stav poznání týkající se složení a organizace membrán, je fakt, že biologické membrány jsou bilaterálně asymetrické v rozložení proteinů i lipidů.^{/46,47/} Tato asymetrie je známa v rovině laterální (stranové, 2D), což odpovídá Karnovského teorii lipidových domén i nerovnoměrnému rozložení a shlukování proteinů uvažovaných Singerem s Nicolsonem. Navíc je známa i transversní (příčná, 3D) asymetrie složení vnitřní a vnější membránové vrstvy, které obsahují odlišné proteiny i lipidy. Asymetrie lipidového složení vrstev membrány (polarizace membrány) je buňkou aktivně udržována činností specializovaných enzymů – flipas, flopas a skramblas.^{/47/}

1.3.2. Složení biologických membrán

Eukaryotické biologické membrány obsahují jako své lipidické komponenty steroly (u savců cholesterol) a mnoho druhů glycerofosfolipidů, sfingolipidů a od nich odvozených derivátů, jako jsou glyko(fosfo)lipidy (Obr. 4, str. 23).^{/46/}

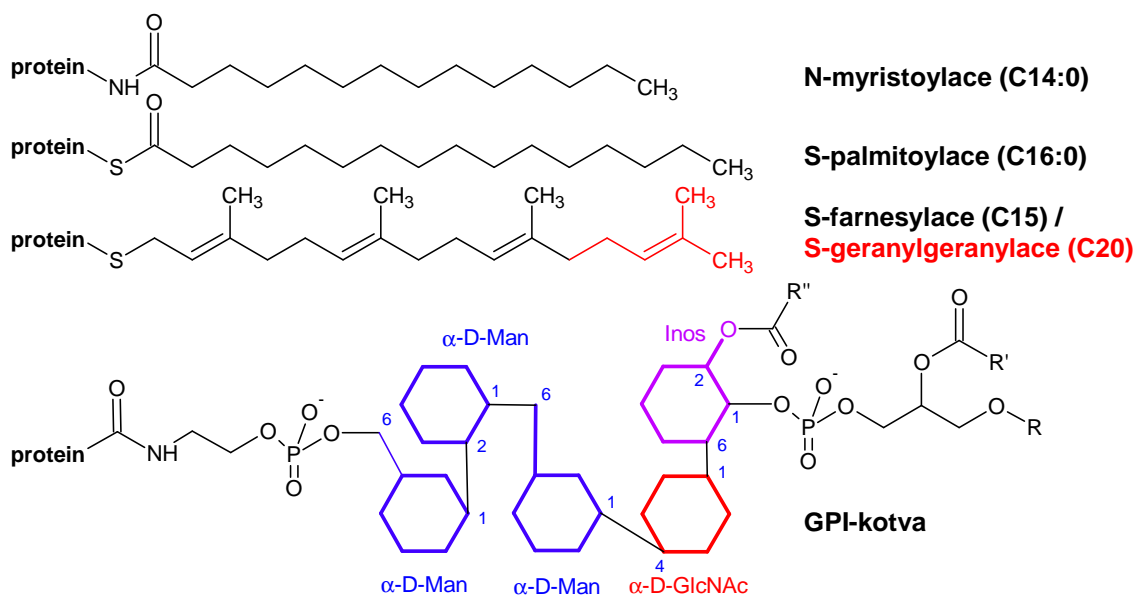
Jednotlivé lipidy se mohou lišit délkou zbytků mastných kyselin, mírou jejich nenasycenosti, polární skupinou či sacharidovou strukturou a druhem její vazby na kostru lipidu. Glycerofosfolipidy, obsahující nasycené i nenasycené acylové skupiny různých délek, obvykle v membránách preferenčně existují ve více fluidním stavu („liquid crystalline state“ nebo „liquid disordered phase, L_d “), kdy jsou jejich acylové zbytky v membráně neuspořádané.^{/48/} Oproti tomu sfingolipidy obvykle nesou delší nasycené acylové řetězce, které lépe umožňují těsné sbalení a tvorbu uspořádané gelové fáze („gel phase“).^{/48/} Přítomnost cholesterolu ve sfingolipidové fázi vede ke snížení stupně její uspořádanosti a dává vzniknout tzv. „liquid-ordered, L_o “ fázi, kdy jsou nasycené acylové postranní řetězce sfingolipidů vysoce organizovány podobně jako v gelové fázi, ale je stále umožněn laterální difusní pohyb celých molekul sfingolipidu membránou.^{/48/} U směsí glycerofosfolipidů a sfingolipidů byla *in vitro* pozorována samovolná fázová separace.^{/48/}

Dále membrány obsahují velké množství zanořených integrálních membránových proteinů a periferních proteinů, které sice nejsou přímo zanořeny do membrány, ale jsou s ní asociovány. U integrálních membránových proteinů rozhoduje o jejich lokalizaci v membráně rozložení polárních a nepolárních postranních řetězců aminokyselin na jejich povrchu. U periferních proteinů asociovaných s membránami jsou rozhodujícím faktorem jejich lokalizace posttranslační modifikace proteinu (Obr. 5, str. 24) či elektrostatické a iontové interakce mezi povrchem proteinu a polárními skupinami lipidů.



Obr. 4: Běžné komponenty biologických membrán. A – glycerofosfolipidy, B – sfingolipidy, C – steroly. Řetězce mastných kyselin R, R' a R'' mohou být různé délky. Hydrofilní skupiny X mohou také být různých typů, vyobrazeny jsou pouze některé nejběžnější složky membrán. Glc – glukosa, Gal – galaktosa, Sia – kyselina sialová.

Typickými posttranslačními modifikacemi proteinů, které se uplatňují při membránové lokalizaci jsou modifikace: mastnými kyselinami – acylace (palmitoylace, myristoylace), isoprenoidními látkami – prenylace (farnesylace, geranylgeranylce), vazbou na cholesterol či na některou z GPI (glykosylfosfatidylinositolových) kotev (Obr. 5, str. 24).^{/46,48/}



Obr. 5: Proteinové posttranslační modifikace uplatňující se při asociaci s membránami. GPI kotev existuje velké množství různých druhů. Liší se zejména řetězci R, R' a R'', které mohou být různé délky či stupně nasycenosti. Sacharidová páteř kostry je do určité míry konzervovaná, ale mezi jednotlivými GPI kotvami a organismy mohou být odlišnosti v případných postranních sacharidových strukturách kotvy.

1.3.3. Kaveoly a membránové mikrodomény

V souladu s Karnovského teorií lipidových domén v roce 1997 Kai Simons a Elina Ikonen představili teorii membránových mikrodomén (raftů).^{/49/} Jako membránové rafty označili subkompartmenty biologické membrány s vyšším obsahem cholesterolu a glykosfingolipidů oproti okolní membráně, které se jeví relativně odolné solubilizaci mírnými neionogenní detergenty.^{/48-50/} Jelikož byly primárně definovány na základě své odolnosti vůči detergentům, bývají membránové mikrodomény označovány i jako detergentu odolné membrány (DRM), detergentem nerozpustné glykosfingolipidy nabohacené membrány (DIG), Tritonem nerozpustné membrány (TIM), Tritonem nerozpustná flotující frakce (TIFF) či díky svému neobvyklému složení též glykosfingolipidy nabohacené membrány (GEM), cholesterolem nabohacené membrány (CEM) či jednoduše lipidové rafty.^{/48,50/} V roce 2006 byly membránové rafty předdefinovány jako „malé, 10 – 200 nm velké, heterogenní, vysoce dynamické, steroly a sfingolipidy nabohacené domény, které kompartmentalizují buněčné procesy a mohou na základě protein-proteinových a protein-lipidových interakcí tvořit větší platformy“.^{/51/}

Membránové rafty jsou kvůli svému nabohacení na lipidy s delšími nasycenými acylovými skupinami považovány za tlustší než je okolní membrána.^{/46/} Díky této větší tloušťce v nich mohou být preferenčně zanořeny proteiny s delšími transmembránovými úseky a díky specifickému lipidovému složení (blíže viz část 1.3.5 této práce) jsou

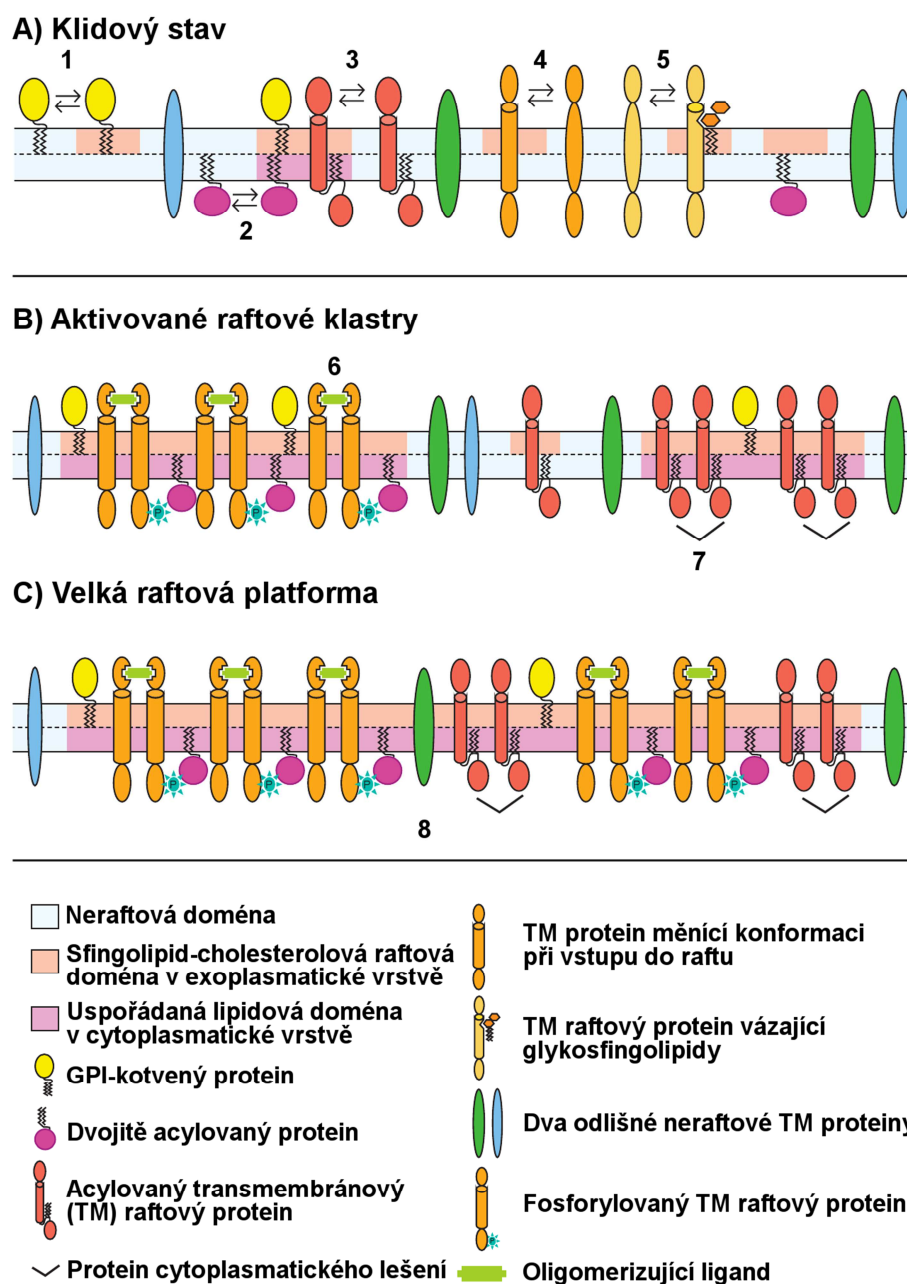
do membránových raftů primárně cíleny některé posttranslačně modifikované membránové proteiny.^{/48,49/} Modifikacemi, u kterých se ukazuje, že směřují proteiny do raftových struktur membrány jsou vazba na různě acylované GPI kotvy, či vícenásobná acylace (myristoylace, palmitoylace).^{/48/} Samotná prenylace byla ukázána jako modifikace snižující tendenci proteinů vyskytovat se v membránových raftech, zatímco proteiny současně prenylované a palmitoylované se v membránových raftech vyskytují.^{/48/} Kromě zmíněných lipid-lipidových interakcí se zdá, že pro lokalizaci proteinu do membránového raftu jsou důležité i protein-lipidové a protein-proteinové interakce.^{/48/}

Kaveoly jsou dlouho známé membránové invaginace, které mohou být považovány za útvary příbuzné planárním membránovým raftům, jelikož obdobně mají vyšší obsah cholesterolu a glykosfingolipidů a jsou taktéž odolné solubilizaci neionogenními detergenty.^{/48,50/} Oproti planárním raftům ovšem kaveoly obsahují cholesterol vázající protein kaveolin, jehož funkcí je pravděpodobně stabilizace invaginované membránové struktury.^{/48,50/} Taktéž je možné kaveoly na rozdíl od planárních membránových domén přímo pozorovat *in vivo* běžnou optickou mikroskopií a morfologicky je charakterizovat jako membránové váčky o průměru asi 25 – 150 nm.^{/48/}

Nicméně, i přes značné množství prací, které za posledních 15 let zabývaly membránovými rafty, není jejich biologická relevance ani vlastní existence *in vivo* zcela všeobecně považována za prokázanou a membránové rafty zůstávají do určité míry kontroverzním tématem.^{/52/} Diskutována je zejména jednoznačnost interpretace a biologická relevance izolací využívajících rezistenci vůči solubilizaci detergenty, stejně jako nejasné principy membránové organizace a komunikace mezi vrstvami membrány.^{/52/} Prudký rozvoj mikroskopických (zejména fluorescenčních) metod, spolu se syntézou nových proteinových a lipidových fluorescenčních značek pro membránové rafty, ovšem v posledním desetiletí podstatně zlepšil možnosti přímé vizualizace membránových domén.^{/53-55/} Fluorescenční mikroskopické techniky, které našly uplatnění při studiu organizace a difusní dynamiky membrán jsou například fluorescenční korelační spektroskopie (FCS), Försterův rezonanční přenos energie (FRET), metoda obnovy fluorescence po fotovybělení (FRAP) či dvoufotonová mikroskopie.^{/55/} Pomocí těchto metod vizualizace bylo mimo jiné ukázáno, že na modelových i buněčných membránách skutečně může docházet k separaci fosfolipidových fází dle jejich lipidového složení a specifickému rozdělování GPI-kotvených proteinů mezi tyto fáze.^{/46,53-55/} Otázkou ovšem stále zůstává, do jaké míry izolace membránových raftů pomocí solubilizace detergenty odráží jejich skutečné složení a morfologii na buněčné membráně.

1.3.4. Dynamika membránových mikrodomén a buněčná signalizace

Membránové mikrodomény dle posledních zjištění, získaných zejména pokročilými mikroskopickými technikami, nejsou statickými a trvalými strukturami, jak by se mohlo zdát z dřívějších prací.^{/46/} Teorie membránových raftů v současnosti rozlišuje klidové membránové rafty, které jsou velmi malými (nanoskopickými) shluky raftových lipidů a proteinů.^{/46,56/} Tyto jednotlivé „nanorafty“, které jsou dlouhodobě nestálé a mají fluktuující



Obr. 6: Model dynamiky membránových mikrodomén a způsobů asociace proteinů s membránou. V klidovém stavu (A) jsou rafty vysoce dynamickou fluktuující strukturou na nanometrové úrovni. Po aktivaci (B) dochází ke shlukování nanoraftů do větších funkčních celků. Velké raftové platformy (C) vznikají až po rozsáhlých strukturálních změnách membrány. Převzato a upraveno z /46/.

povahu, obsahují jednu či několik málo makromolekul raftových proteinů (Obr. 6, str. 26, horní panel).^{/46/} Mezi raftem a okolní membránou může dynamicky docházet k rozdělování raftových proteinů na základě lipid-lipidových či protein-lipidových interakcí. Ve vnější (exoplasmatické) vrstvě cytoplasmatické membrány se jedná o interakci GPI-kotvy se sfingolipid-cholesterolovým raftem – viz Obr. 6 (1), str. 26, přímou lipid-proteinovou interakci transmembránového proteinu s raftem (4), či interakci proteinu s raftovým glykosfingolipidem (5).^{/46/}

Jiná situace je ve vnitřní (cytoplasmatické) vrstvě membrány, která díky transversní asymetričnosti rozložení lipidů není bohatá na sfingolipidy (lipidové složení raftu vzniklého na cytoplasmatické straně membrány či případné mechanismy komunikace / asociace mezi vrstvami membrány nejsou doposud objasněny).^{/46,50/} Na této straně membrány přecházejí proteiny mezi rafty a okolní membránou na základě své dvojité acylace (2) či acylace a interakce transmembránové domény s membránou (3).^{/46/} Po stimulaci, jakou může být například oligomerizace raftových proteinů multimerním ligandem (6) či cytoplasmatickým molekulárním lešením (7) dochází v součinnosti s aktinovým kortexem a myosinovými molekulárními motory k reorganizaci nanoskopických raftů, k jejich stabilizaci a shlukování ve větší (byť stále nerozlišitelné klasickou optickou mikroskopií) membránové domény (Obr. 6, str. 26, střední panel).^{/46,56/} Tímto shluknutím a fúzí nanoskopických raftů se do blízkého kontaktu dostávají různé proteiny, původně izolované v oddělených nanoskopických raftech. Je známo, že mnoho z těchto proteinů se účastní membránové signalizace, ať již se jedná o (ko)receptory, proteinové kinasy, G-proteiny či proteiny fungující coby molekulární lešení.^{/50,56-59/} Kolokalizace takovýchto molekul v signalizačních platformách, jakými mohou být membránové rafty, usnadňuje a urychluje průběh reakcí signalizační kaskády a zvyšuje tak efektivitu signalizace. K rozsáhlému spojování raftů a tvorbě velkých (několik set nanometrů) doménových platform (Obr. 6, str. 26, spodní panel, 8) dle současné verze raftové teorie dochází až při větších strukturních změnách, jakými mohou být například rozsáhlejší fosforylace, po kterých dochází ke zvyšování počtu protein-proteinových interakcí a k asemblaci supermolekulárních signalizačních struktur.^{/46,59/}

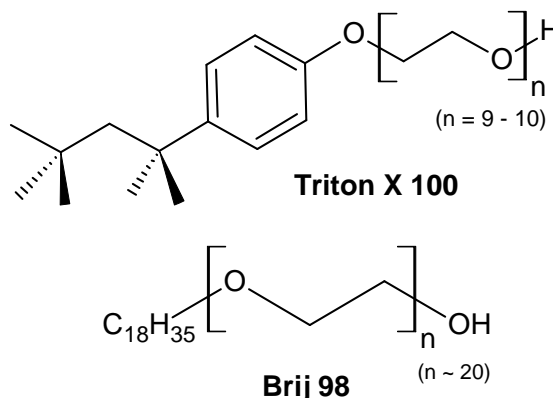
Kromě signalizačních procesů bylo navrženo zapojení membránových raftů i do mnoha jiných buněčných procesů, jakými jsou například endocytické procesy, vnitrobuněčný transport cholesterolu a dalších membránových komponent, buněčná polarizace, tvorba imunologické synapse či pučení nových virových částic z buňky.^{/48,60/}

1.3.5. Izolace detergentu-rezistentních membrán (DRM) a membránové rafty

Odolnost vůči solubilizaci mírnými neionogenními detergenty byla od počátku teorie membránových raftů úzce spjata s jejich zkoumáním a byla též původně použita pro definici membránových raftů.^{/51,61/} Základním poznatkem bylo, že některé části membrán buněčného homogenátu za chladu odolávají působení 1% Tritonu X-100. Následně díky své nízké hustotě, způsobené obsahem lipidů, flotují při isopyknické centrifugaci v sacharosovém gradientu ve vrstvách s nižší koncentrací sacharosy (a tudíž i nižší hustotou).^{/50,61,62/} Takto získaná frakce membrán byla označena jako detergentu-rezistentní membránová frakce (DRM) a bylo ukázáno, že je bohatá na cholesterol, sfingomyelin, protein flotilin či GPI-kotvené proteiny.^{/48,50/}

Mimo „standardně“ užívaného detergentu Triton X-100 byly též testovány další neionogenní detergenty v různých koncentracích, mezi kterými byly například Nonidet P-40, oktylglukosid, Lubrol WX a PX, CHAPS, Tween-20 nebo Brij-98, -96 či -58.^{/48,50,60-62/} Kromě solubilizace detergenty byly též vyvinuty metody izolace membránových raftů bez použití detergentů.^{/48,63/} Nepříliš překvapivě bylo zjištěno, že proteiny přítomné v DRM frakci se mezi jednotlivými podmínkami izolace sice do jisté míry překrývají, ale jsou mezi nimi i podstatné rozdíly a použité detergenty se jasně liší svojí selektivitou izolace určitých proteinů v DRM.^{/48,50,59,61/} Lipidomickými studiemi bylo též zjištěno, že různé podmínky izolace vedou k odlišným lipidovým profilům DRM.^{/48,50,61,64/}

Kupříkladu srovnání DRM získaných solubilizací 1% Tritonem X-100, 1% Brijem-98 (Obr. 7) a metodou bez využití detergentu ukázalo, že ve všech třech preparacích byly získané membránové frakce, oproti výchozím membránám post-nukleární buněčné frakce, významně nabohaceny cholesterolem a sfingomyelinem



Obr. 7: Struktury neionogenních detergentů polyoxyethylenového typu Triton X-100 a Brij-98.

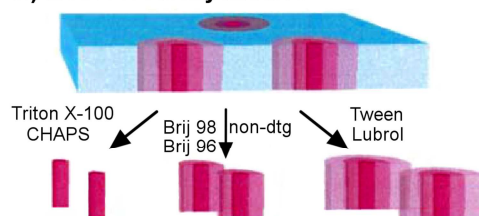
(SPM), zatímco fosfatidylcholin (PC) a fosfatidylinositol (PI) byly částečně depletovány.^{/64/} Rozdíl mezi preparacemi spočíval zejména v obsahu fosfatidylethanolaminu (PE) – typického lipidu vnitřní vrstvy membrány – a poměru SPM – typického pro vnější vrstvu membrány – k ostatním lipidům.^{/64/} Pike *et al.* z těchto a dalších dat lipidomické studie vyvodili, že DRM izolované pomocí Tritonu byly na rozdíl od membrán připravených pomocí Brije či bez detergentů složeny primárně z lipidů

exoplasmatické vrstvy membrány, zatímco lipidy vrstvy cytoplasmatické byly do značné míry depletovány.^{/64/} Tyto rozdíly ve zmíněné studii korelovaly s přítomností receptoru pro epidermální růstový faktor v membránových frakcích jednotlivých preparací, kdy byl tento receptor získán pouze v preparacích, které lépe zachovaly pravděpodobný přirozený poměr lipidů obou vrstev membrány.^{/64/}

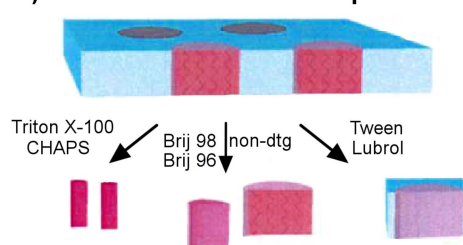
Na základě znalostí o rozdílné selektivitě detergentů při izolacích DRM bylo navrženo několik modelů struktury lipidových raftů (Obr. 8).^{/48/} Model vrstvených raftů předpokládá existenci „jádra“ raftu, které je svým složením odolnější vůči solubilizaci než okrajové části raftu (I). Model selektivní extrakce lipidů naopak předpokládá homogenní rafty, při jejichž extrakci ovšem dochází arteficiálně působením detergentů k selektivní extrakci a nabohacení pouze některých lipidů fyziologicky přítomných v raftu (II). Třetí model předpokládá koexistenci raftů různého složení v rámci jedné membrány (III).^{/48/}

Do jaké míry izolované membránové frakce (ať již s detergenty či bez nich) odráží skutečné fyziologické útvary v membránách, případně který z modelů organizace raftů nejlépe odpovídá skutečnosti, jsou otázky, na něž prozatím věda nezná přesnou odpověď.

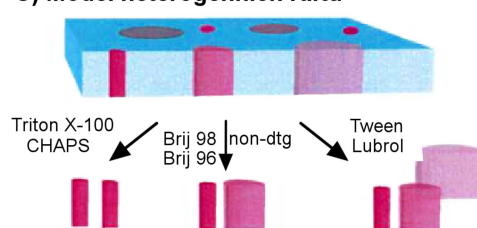
A) Model vrstvených raftů



B) Model selektivní extrakce lipidů



C) Model heterogenních raftů



Obr. 8: Modely heterogenity membránových raftů. Všechny navržené modely vysvětlují vznik DRM o různém proteinovém i lipidovém složení solubilizací rozdílnými detergenty a nedetergentovými metodami. Převzato a upraveno z /48/.

1.4. Proteomika a hmotnostní spektrometrie

Proteomika zkoumá funkce genů v buňkách na úrovni exprimovaných proteinů.^{/65,66/} Proteom je definován jako exprimovaný komplement genomu.^{/65/} Klasické přístupy biochemie pro identifikaci proteinů byly postaveny na principu izolace jednotlivých proteinů, jejich purifikaci do homogenity a následných identifikačních pokusech.^{/65/} Vlastní identifikace mohla spočívat v proteinovém *de novo* sekvenování (chemicky, Edmanovým odbouráváním) či v imunodetekci proteinu pomocí specifických protilátek (které ovšem

rozpoznávají pouze určitý omezený epitop v proteinu). Historie proteomiky, jako snahy o sledování a analýzu velkých množství proteinů současně, sahá do 70. let, kdy byla objevena technika vícerozměrné gelové elektroforesy umožňující analýzu stovek proteinů současně.^{/66/} Nicméně metody postupných identifikací jednotlivých proteinů byly pracné, časově náročné a nedokázaly držet krok s velkým množstvím genetických dat, získávaných zdokonalujícími se genovými sekvenacemi v 80. a zejména 90. letech.^{/65,66/}

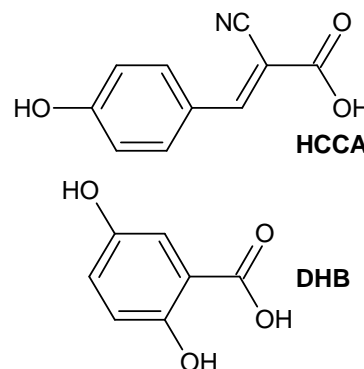
Zásadní změna na poli identifikací proteinů a proteomiky přišla ke konci 80. let s převratnými objevy na poli hmotnostní spektrometrie – metody, do té doby využívané pro analýzy malých organických a anorganických molekul. Tyto objevy spočívaly v nalezení šetrných metod (způsobujících minimální fragmentaci) ionizace analytu a jeho převedení do plynné fáze, vhodných pro velké a netěkavé molekuly jako jsou peptidy a proteiny.^{/65/} Těmito tzv. „měkkými“ metodami ionizace byla ionizace elektrosprejem (ESI), využitá jako rozhraní LC-MS v roce 1985 Fennem^{/67/}, a desorpce/ionizace laserem za přítomnosti matrice, paralelně objevená kolem roku 1987 Tanakou^{/68/} a Karasem s Hillenkampem^{/69,70/}.

1.4.1. Konstrukce hmotnostního spektrometru

Tato kapitola se bude detailněji zabývat konstrukcí hmotnostního spektrometru typu MALDI-TOF / MALDI-LIFT-TOF/TOF, i když jsou pro proteomické studie s úspěchem využívány i instrumenty s ionizací pomocí elektrospreje či jinými typy hmotnostních analyzátorů. Těmi mohou být například trojitý kvadrupól (QqQ, TSQ), iontová past (IT), hybridní kvadrupól s analyzátorem doby letu (qTOF), analyzátor/detektor typu OrbiTrap s Fourierovou transformací (FT-OT) či analyzátor/detektor na bázi iontové cyklotronové resonance s Fourierovou transformací (FT-ICR).^{/71/}

Každý moderní hmotnostní spektrometr se skládá ze čtyř základních částí – iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru a řídicího počítače. Účelem iontového zdroje je ionizace analytu, jeho převedení do plynné fáze a zavedení do vakua uvnitř spektrometru. Často využívanou metodou ionizace biomolekul je technika MALDI (desorpce/ionizace laserem za přítomnosti matrice). U této techniky je malé (submikrolitrové) množství analytu deponováno na MALDI desku (obvykle z leštěné oceli, v některých případech s částečnou hydrofobní povrchovou úpravou – AnchorChip) spolu s roztokem MALDI matrice.^{/66/} Matricí je obvykle organická nízkomolekulární látka, která je dobře rozpustná v rozpouštědle analytu, je schopna protonovat či deprotonovat analyt a absorbuje záření při vlnové délce používaného laseru (obvykle UV – lasery typu N₂,

Nd:YAG či solid-state SmartBeam, ale je možný i IR laser).^{/66,72/} Jako obvyklá matrice pro MALDI peptidů se používá kyselina p-hydroxy- α -kyanoskořicová (HCCA) a pro celé proteiny kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB) – (Obr. 9).^{/66/} Deponovaná matrice se vzorkem je následně ozářena nanosekundovými laserovými pulsy, což vede k absorpci energie záření molekulami matrice, její ablaci společně se vzorkem a reakcím v plynné fázi mezi matricí a analytem. Při těchto dochází k předávání



Obr. 9: Struktury běžně používaných MALDI matricí pro MS. HCCA – peptidová matrice, DHB – matrice pro proteiny.

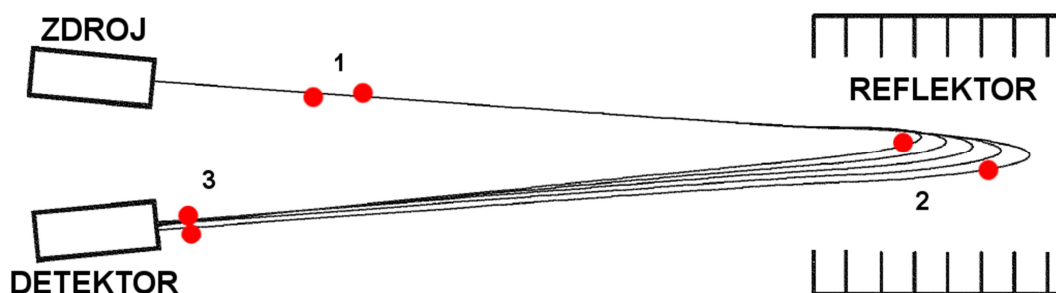
energie mezi molekulami, protonaci a zpětné deprotonaci molekul analytu, což má za důsledek preferenční výskyt iontů analytu nesoucích jednotkový náboj.

Ionty jsou následně účinkem energeticky i časově přesného pulsu urychlovacího napětí převedeny do hmotnostního analyzátoru, který je srdcem celého hmotnostního spektrometru.^{/71/} Při převodu z iontového zdroje mohou být některé rozsahy poměrů hmotnosti m/z iontovou optikou deflektovány (využíváno např. pro potlačení nízkomolekulárních signálů způsobených klastry matrice). Hmotnostní analyzátor doby letu (TOF) je velmi vysoce vakuovaná trubice, ve které již na ionty nepůsobí žádné urychlující síly. Ionty, které byly všechny urychleny stejnou akcelerační energií E_{acc} , se dělí na základě své hmotnosti m (přesněji v poměru k náboji m/z), dle klasického vztahu pro kinetickou energii E_k :

$$E_{acc} = E_k = \frac{1}{2}mv^2$$

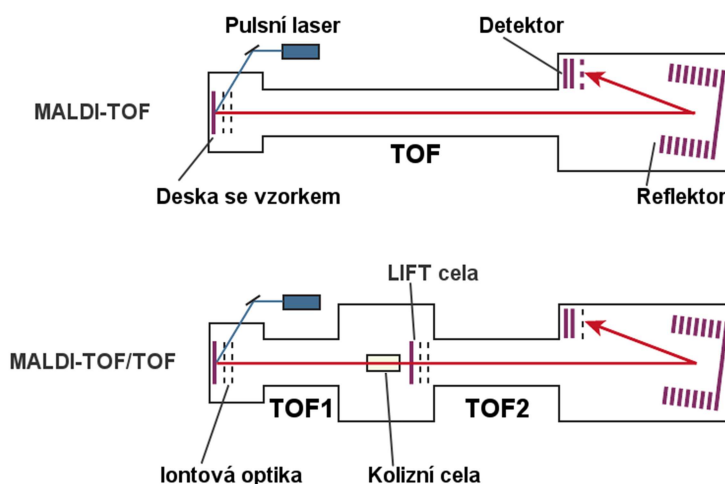
a letovou trubicí proletí za různé časy, jelikož letí různou rychlostí v . Pro zpřesnění měření a zvýšení jeho rozlišení byl pro měření peptidů do trajektorie iontů přidán tzv. „reflektor“ (někdy též reflekttron či iontové zrcadlo / ion mirror). Tento prvek kompenzuje neideálnost urychlení jednotlivých iontů analytu, kdy v reálném spektrometru existuje oproti ideálnímu teoretickému stavu pro jednotlivé ionty (stejněho) analytu určitá distribuce kinetických energií a rychlostí.^{/73/} Tato distribuce vzniká, jelikož v iontovém zdroji, v momentě vložení urychlovacího napětí, se jednotlivé ionty nacházejí v oblaku ablatované matrice s analytem, nejsou zcela stejně daleko od čoček urychlovací iontové optiky a mají určitou nenulovou počáteční rychlost.^{/73/} Iontový reflektor je soustavou elektrod, které generují pro ionty analytu odpudivé elektrostatické pole. Potenciál pole je nastavený tak, aby ionty o stejné hmotnosti ale různé počáteční rychlosti, a tudíž i různé hybnosti, pronikly různě hluboko do reflektoru než budou vypuzeny zpět (a mírně stranově odkloněny) směrem

k detektoru.^{/73/} Potenciál pole reflektoru je takový, že rozdíl v dráze jednotlivých iontů o stejné hmotnosti uvnitř reflektoru koriguje rozdíl v dráze získaný v důsledku různých rychlostí v letové trubici (Obr. 10).^{/73,74/}



Obr. 10: Schématický náčrt funkce reflektoru (iontového zrcadla). Červeně znázorněné ionty mají stejnou hmotnost i náboj, ale v důsledku neideálnosti urychlení v iontovém zdroji se pohybují mírně odlišnou rychlostí (1). Dráhový rozdíl iontů v poli reflektoru (2) kompenzuje rychlost iontů tak, aby na detektor dopadly současně (3). Převzato a upraveno dle /73/.

V případě měření v MS/MS módu (Obr. 11) s fragmentací molekul kolizí (CID), je do dráhy iontů v letové trubici (v některých provedeních ihned za iontovým zdrojem) vřazena navíc kolizní cela. V této cele je udržován určitý tlak kolizního plynu, kterým bývá obvykle dusík či argon. V první (TOF1) části analyzátoru dojde k rozdělení různých iontů analytu dle jejich rychlosti letu a iontová optika vpustí do kolizní cely pouze prekursorový iont určený pro fragmentaci. Alternativně dojde k fragmentaci všech iontů v kolizní cele či spontánním PSD rozpadem (viz část 1.4.2 této práce) ihned za iontovým zdrojem a selektovány jsou až rozpadové produkty v části TOF1 - jelikož pochází ze stejného prekursoru o určité rychlosti, mají i veškeré fragmenty stejnou rychlost (ovšem dle své rozdílné hmotnosti rozdílnou E_k) a pohybují se společně.^{/71,74/} Fragmenty prekursorového iontu jsou dále urychleny pulsem napětí v LIFT cele a v části TOF2 již absolvují dělení dle své rychlosti letu, obdobně jako při MALDI-



Obr. 11: Schéma uspořádání MALDI-TOF a TOF/TOF hmotnostních spektrometrů. Kolizní cela v TOF/TOF uspořádání může též být umístěna těsně za iontovou optikou ve zdroji nebo, v případě PSD fragmentace, může chybět zcela. Převzato a upraveno z /71/.

TOF experimentu.^{/71,74/} V důsledku (na hmotnosti závislých) rozdílů E_k jednotlivých fragmentů navíc dochází k hmotnostní separaci iontů v reflektoru, jelikož ionty s vyšší

energií jsou odraženy při vyšším potenciálu hlouběji v reflektoru a mají tak delší trajektorii.^{/74,75/}

Detekce iontů probíhá pomocí elektronických detektorů různých typů. Obecně se obvykle jedná buď o detektor na bázi Faradayovy klece (elektroda nesoucí záporný náboj, jehož úbytek vlivem kationtů analytu je měřen), kaskádového fotonásobiče (s primárním převodem iontu na foton kolizí s fosforovou destičkou) či kaskádového elektronového násobiče (s konverzí iontu na elektrony srážkou s první z řady dynod).

1.4.2. Hmotnostně spektrometrická identifikace proteinů

Pro hmotnostně spektrometrickou identifikaci proteinů jsou využívány dva odlišné přístupy, oba založené na identifikaci proteinu dle peptidových štěpů, kterým dá vzniknout jeho enzymatická hydrolýza.

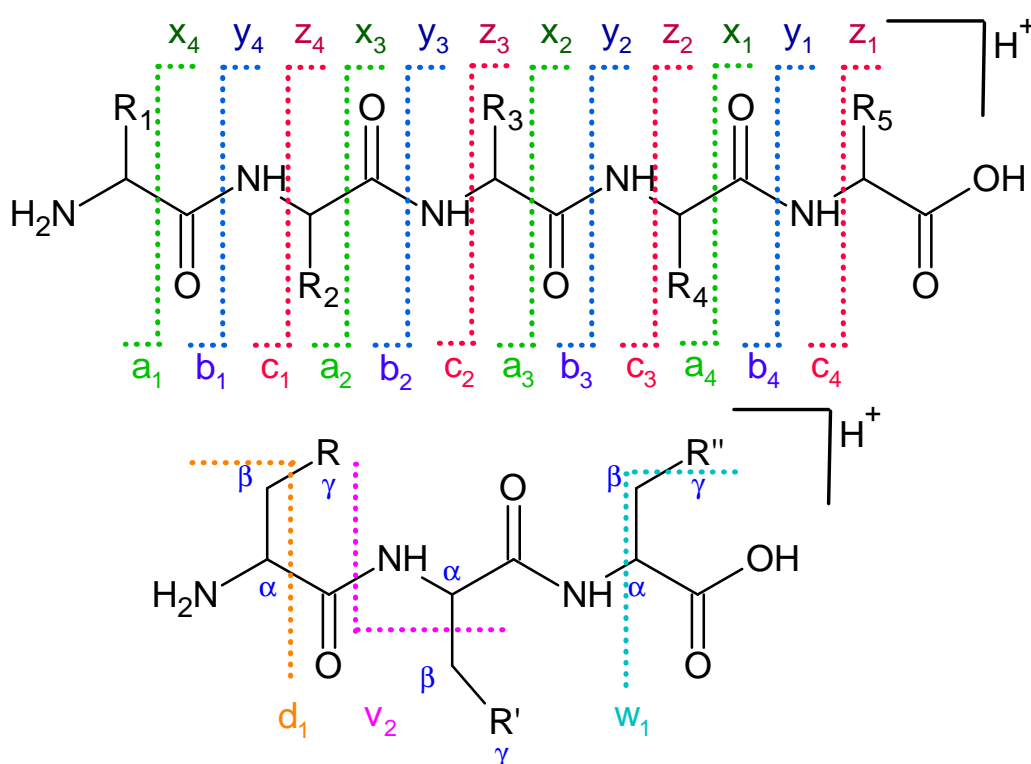
Prvním přístupem je technika peptidového hmotnostního mapování (peptide mass fingerprinting, PMF).^{/66,67/} Tento způsob identifikace je založen na faktu, že z proteinu o určité unikátní primární aminokyselinové sekvenci po specifické proteolýze vznikne unikátní soubor peptidů o různých hmotnostech. Směs těchto hydrolytických peptidů je analyzována hmotnostním spektrometrem a výsledné spektrum peptidové směsi je porovnáno s teoreticky predikovanými peptidovými spektry proteinů, obsaženými v databázích známých aminokyselinových sekvencí.^{/66,67/}

Druhou identifikační technikou je tzv. technika peptidového mikrosekvenování, jejímž cílem je identifikovat peptid nikoli pouze na základě jeho poměru m/z , ale i na základě údajů o jeho aminokyselinové sekvenci. Informace o primární aminokyselinové struktuře peptidu je získána ve hmotnostním spektrometru, který je schopen peptid fragmentovat. Ze vzniklých fragmentových iontů je možné určit pořadí aminokyselin v peptidu buď porovnáním spektra se simulovaným fragmentovým spektrem peptidu z proteinové databáze nebo tzv. postupem „*de novo* sekvenování“, kdy lze sekvenci aminokyselin přímo odečíst z hmotnostních diferencí mezi píky fragmentového spektra.

MS/MS spektra mohou být získána různými způsoby fragmentací prekurzorového iontu, při kterých obecně dochází k přenosu energie na ion analytu a k její redistribuci v rámci molekuly, následované rozpadem některé z vazeb mezi atomy iontu.^{/76/} Nejčastěji užívaným postupem je kolizí aktivovaná / indukovaná disociace (CAD či CID), kdy dochází k energetickým změnám v molekule urychleného prekurzorového iontu při srážce s molekulami inertního plynu (obvykle He či Ar).^{/76/} Jinými postupy jsou „horké“, laserem indukované, techniky fragmentace ve zdroji (ISD) či za zdrojem (PSD), využívající

spontánního rozpadu iontu majícího vysokou vibrační energii. Zejména u analyzátorů typu iontové pasti, FT-OT či FT-ICR jsou také využívány fragmentační techniky elektronového záchytu či přenosu (ECD a ETD), založené na samovolném štepení kation-radikálu vzniklém záchytem volného elektronu či přenosem elektronu z donorové molekuly. U těchto analyzátorů je také možné využití absorbního přenosu vibrační energie technikou infračervené multifotonové disociace (IRMPD).^{/65,76/}

Jednotlivé techniky fragmentace dávají (dle množství aktivační energie přenesené na ion a dle vnitřní struktury iontu) vzniknout různým typům lineárních peptidových fragmentových iontů, pro něž byla vytvořena systematická nomenklatura (Obr. 12).^{/77,78/}



Obr. 12: Nomenklatura fragmentových iontů peptidu. K základním iontovým sériím a , b , y též mohou vznikat ionty se ztrátou molekuly NH_3 (a^* , b^* , y^*) či H_2O (a^0 , b^0 , y^0). Zpracováno dle /76 – 78/.

Při PSD fragmentaci peptidů ve spektrometru typu MALDI-LIFT-TOF/TOF preferenčně vznikají základní ionty sérií a , b , y vzniklé fragmentací polypeptidové kostry a dále (v závislosti na aminokyselinové sekvenci peptidu) k nim příslušné ionty se ztrátou molekuly H_2O (a^0 , b^0 , y^0) či NH_3 (a^* , b^* , y^*) či interní fragmenty (ionty typu by či ay vzniklé dvojitou fragmentací).^{/79/} Při vysokoenergetické CID fragmentaci v TOF/TOF spektrometrech jiných provedení se navíc vyskytují satelitní ionty sérií d , v , w (vzniklé štepením postranního řetězce aminokyseliny).^{/79/}

1.4.3. Identifikace složitých směsí proteinů

Proteomické přístupy využívající pro analýzu složitých směsí proteinů dvourozměrné elektroforesy, vyřezávání gelových zón jednotlivých proteinů a jejich následnou separátní identifikaci, začaly být s přibývajícím komplexitou vzorků neúnosně složité a časově náročné. Tyto obtíže byly vyřešeny objevem bezgelové hmotnostně spektrometrické techniky současné analýzy komplexních směsí proteinů.^{/80/} Směs proteinů je podrobena chemické a/nebo enzymatické proteolýze. Vzniklá velmi komplexní směs peptidů je následně separována na koloně s obrácenou fází (1D uspořádání) či na koloně se silným katexovým nosičem, z níž jsou krokově se zvyšující koncentrací soli eluovány frakce na kolonu s obrácenou fází (2D uspořádání). Na koloně s obrácenou fází jsou peptidy separovány gradientem acetonitrilu a přímo analyzovány hmotnostním spektrometrem.^{/80/} Dle hmotnostních spekter jsou následně počítačovým algoritmem identifikovány peptidy přítomné ve vzorku a na jejich základě jsou určeny proteiny, které byly ve vzorku přítomny před proteolýzou.^{/80/} Tento proteomický přístup, který analyzuje komplexní směsný vzorek peptidů a na jejich základě se propracovává k vyšším strukturním jednotkám (celým proteinům) je nazýván „bottom-up“.^{/76/}

Alternativním přístupem k identifikaci složitých směsí proteinů, ukázaným^{/81/} již v roce 1990, který se ale obzvláště rozvíjí až v posledním desetiletí s technologií FT-MS je metoda nazývaná komplementárně „top-down“.^{/76/} Tato metoda identifikace nezahrnuje proteolýzu, ale jednotlivé, kapalinovou chromatografií rozdělené, intaktní proteiny jsou selektovány a nabohaceny v plynné fázi uvnitř hmotnostního spektrometru. Tyto ionty jsou podrobeny fragmentaci a fragmentové ionty jsou identifikovány na základě velice přesně určené hodnoty m/z .^{/76/} Top-down přístup má sice oproti bottom-up identifikaci značné výhody, jakými jsou například teoretické 100% pokrytí sekvence proteinu či jistota přiřazení peptidového fragmentu k určitému proteinu, naráží ovšem na omezenou dostupnost nákladných FT-MS spektrometrů běžnému uživateli či na problémy s analýzou proteinů s vysokou molekulovou hmotností nebo mikroheterogenní primární strukturou (v důsledku posttranslačních modifikací).^{/76/}

1.4.4. Automatická bottom-up MS/MS identifikace proteinů

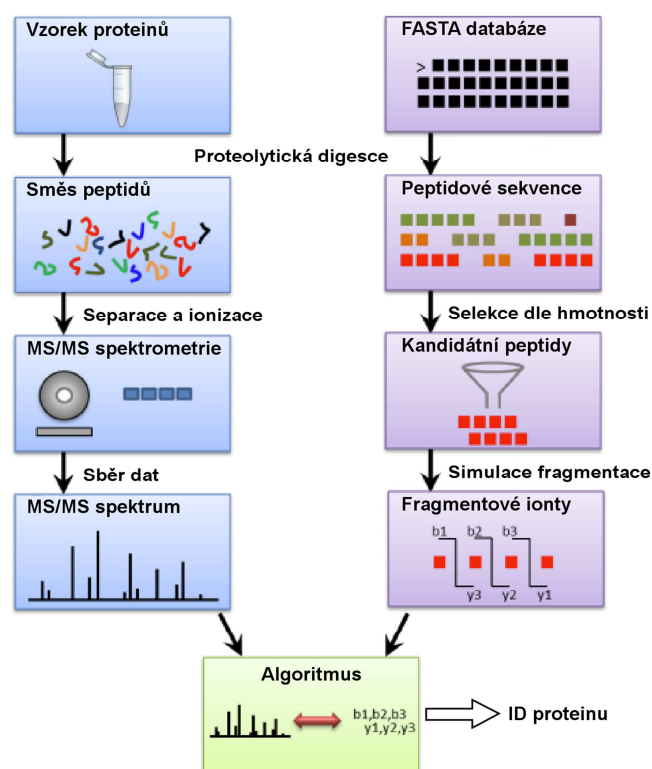
Klíčovým krokem bottom-up identifikace proteinových směsí je vyhodnocení získaných peptidových identifikací a vlastní identifikace proteinů původně přítomných ve vzorku. Pro tyto činnosti jsou využívány plně automatické počítačové algoritmy, jejichž účelem je porovnat experimentálně získaná MS/MS data s daty predikovanými dle

databází primárních proteinových struktur (aminokyselinových či nukleotidových sekvencí). Existuje mnoho různých algoritmů pro automatické identifikace, jakými jsou například SEQUEST, OMSSA, X!Tandem či Mascot.^{/82/} V této práci použitý algoritmus Mascot je komerčním softwarem firmy MatrixScience, který umožňuje automatizované zpracování spektrometrických dat a identifikaci proteinů na základě peptidového mapování (PMF) či peptidové mikrosekvence (MS/MS).^{/83/}

Proces identifikace proteinů ve vzorku na základě MS/MS dat probíhá následovně (Obr. 13): nejprve je zvolena databáze primárních proteinových struktur (aminokyselinových sekvencí ve FASTA formátu) – například manuálně anotovaná a udržovaná neredundantní proteinová databáze UniProtKB/SwissProt.^{/84/} Dle nastavených parametrů vyhledávacího algoritmu jsou z databáze vybrány sekvence všech proteinů zvoleného cílového organismu. Podle známých štěpných specifit proteas či chemických činidel, použitých ke štěpení vzorku, je pro každou aminokyselinovou

sekvenci z databáze *in silico* simulována hydrolytická digeste a pro každý hypotetický vzniklý peptid je simulováno teoretické fragmentační spektrum (přičemž u jednotlivých fragmentových iontů není uvažována rozdílná intenzita).^{/79,83,85/}

Vůči takto připravené databázi teoretických peptidů jsou porovnávána experimentální data. Pro každé MS/MS spektrum reálných experimentálních dat jsou z *in silico* vytvořené databáze teoretických peptidů vybrány kandidátní peptidy se stejným m/z (v rámci určité tolerance přesnosti měření) jako měl prekurzorový ion experimentálně změřeného spektra. U všech takto vybraných databázových peptidů jsou porovnána modelovaná fragmentační spektra s reálným spektrem a míra jejich shody je určena dle upraveného skórovacího algoritmu MOWSE.^{/79,83,85,86/} Tímto algoritmem je pro teoretická



Obr. 13: Proces identifikace proteinů ve vzorku pomocí MS/MS. Srovnání reálného zpracování vzorku (vlevo) a *in silico* zpracování proteinové databáze (vpravo). Identifikace je výsledkem porovnání reálných fragmentačních spekter s fragmentačními spektry simulovanými dle aminokyselinové sekvence v databázi. Převzato a upraveno z /85/.

spektra na základě jejich podobnosti s reálnými daty určena pravděpodobnost P , že je identifikace náhodná.^{/79,83,86/} Teoretické spektrum s nejmenší pravděpodobností je prohlášeno za pozitivní identifikaci, jejíž signifikance ovšem záleží na hodnotě P a množství spekter kandidátních peptidů testovaných proti experimentálnímu spektru.^{/79,83,86/} Obvyklou používanou hodnotou hranice signifikance je $p < 0,05$ (< 5% šance, že identifikace je náhodná) či $p < 0,01$. Jelikož pravděpodobnosti P pro jednotlivé identifikované peptidy jsou obvykle velmi malá čísla, je názornější převést pravděpodobnost náhodnosti identifikace P na skóre identifikovaného peptidu dle vztahu^{/79,83/}:

$$ion\ score = -10 \times \log_{10}(P)$$

Zjevně platí, že čím větší skóre, tím menší pravděpodobnost, že je identifikace výsledkem náhodného procesu. Ve výše uvedeném popisu identifikace byly pro zjednodušení vynechány některé podstatné doplňující parametry jako počet tolerovaných vynechaných štěpných míst při proteolýze, tolerance přesnosti měření v MS/MS módu, druh ionizace a fragmentace (určující, které iontové série budou simulovány při *in silico* digesti) nebo přítomnost fixních a/nebo variabilních modifikací na některých aminokyselinách.^{/79,83/}

Seznam identifikovaných proteinů je vytvořen na základě informací o tom, ze kterého *in silico* štěpeného proteinu v databázi jednotlivé identifikované peptidy pocházejí. Peptidy příslušející ke stejnému proteinovému záznamu v databázi jsou sdruženy a jsou vypočteny skóre identifikovaného proteinu jako celku.^{/79/} Identifikace proteinu jsou považovány za signifikantní, pokud jejich skóre překročí hranici stanovenou dle určité požadované hodnoty signifikance. Ve standardní verzi je skóre proteinu určeno dle vzorce:

$$protein\ score = \sum_{i=1}^N ion\ score_i$$

kde N je počet peptidových identifikací přiřazených k proteinu. V případě, že jsou prohledávána velká množství experimentálních spekter vůči velkým databázím proteinů, je vyšší pravděpodobnost, že některé proteiny při standardním výpočtu skóre přesáhnou hranici signifikance pouze na základě velkého množství neurčitých identifikací peptidů s nízkým skóre.^{/79/} V takovémto případě se užívá striktnější „MudPIT“ skóre dle vzorce:

$$protein\ score = ion\ score_{cut\ off} + \sum_{i=1}^{N'} (ion\ score_{i,signif} - ion\ score_{cut\ off})$$

kde $ion\ score_{cut\ off}$ je hraniční hodnota skóre pro zvolenou signifikanci p , N' je počet peptidových identifikací se skóre vyšším než $ion\ score_{cut\ off}$ a $ion\ score_{i,signif}$ je skóre peptidové identifikace, které je vyšší než $ion\ score_{cut\ off}$.^{/79/}

1.4.5. Problém odvození proteinů („protein inference“)

Technika bottom-up identifikace proteinů má slabé místo ve skutečnosti, že u jednotlivých identifikovaných peptidů není z experimentálních dat možné přímo provést jednoznačné přiřazení určitých peptidů k výchozímu proteinu.^{/79/} Největším problémem je, že většina identifikovaných peptidových sekvencí není unikátní pro jediný protein.^{/79/} Tento problém, jak na základě ne zcela unikátních peptidů identifikovaných ve vzorku odvodit nejpravděpodobnější výchozí složení proteinů ve vzorku před proteolýzou, je řešen statistickými přístupy.^{/79/} Způsob řešení tohoto problému je založen na principu maximální parsimonie^{/79/}, dle svého objevitele, středověkého matematika Williama z Ockhamu, též známém pod názvem „Ockhamova břitva“. Tento princip v určitém zjednodušení říká, že pokud jsou k dispozici dvě odlišné teorie, vysvětlující určitý problém, je pravděpodobnější ta, která vychází z menšího počtu vstupních předpokladů. Na příkladu identifikací proteinů to znamená, že pokud jsou kupříkladu identifikovány 4 peptidy, 2 vysvětlitelné přítomností v proteinu A a 2 v proteinu B, ale všechny přítomné v proteinu C, je dle principu maximální parsimonie nejpravděpodobnější, že původní vzorek obsahoval pouze protein C, který bude považován za jediný identifikovaný.^{/79/} Implementace principu maximální parsimonie do algoritmu Mascot je složitější, využívající další postupy a parametry zde detailně nerozebírané.^{/79/} Využitím těchto parametrů v kombinaci se skórovacím algoritmem MudPIT je cestou, jak co nejlépe vyfiltrovat z výsledků proteinových identifikací homologní proteiny a proteiny, které byly identifikovány pouze na základě mnoha nepříliš průkazných fragmentačních spekter.^{/79/} Rizikem tohoto postupu ovšem je, že v některých případech může být mezi identifikovanými peptidy místo proteinu reálně přítomného ve vzorku za identifikovaný označen protein nesprávný.^{/79/}

1.4.6. Nezávislá statistická validace výsledků identifikace

Pro automatickou identifikaci proteinů dle MS/MS dat algoritmem Mascot je klíčovým prvkem míra signifikance jednotlivé identifikace proteinu (viz část 1.4.4 této práce), někdy též označovaná zkratkou PEP (posterior error probability).^{/79,87/} Tato hodnota v sobě skrývá pravděpodobnost, že daná identifikace je výsledkem náhody a je závislá na použitém identifikačním a skórovacím algoritmu.^{/79,87,88/} Pro ověření výstupů identifikačních algoritmů, umožnění srovnání výsledků analýz dat pomocí různých algoritmů a pro přehlednou demonstraci výsledků identifikace bylo navrženo, aby byly výsledky identifikací prováděné na rozsáhlých souborech dat podrobeny dalším statistickým testům,

které nezávisle na použitém skórovacím algoritmu umožní odhad procenta falešně pozitivních výsledků.^{/79,87,88/} Procento falešně pozitivních výsledků (FDR) se určí vzorcem:

$$FDR = \frac{FP}{FP + TP} \times 100\%$$

kde FP (false positive) je počet falešně pozitivních identifikací a TP (true positive) je počet pravých pozitivních identifikací ve výstupu identifikačního algoritmu.^{/79,87/}

Pro určení počtů TP a FP mezi identifikacemi jsou využívány tzv. klamné („decoy“) databáze.^{/79,88/} Identifikační procedura souboru experimentálních spekter je provedena oproti peptidové databázi, která vznikla spojením původní peptidové databáze (vzniklé *in silico* digescí proteinové databáze jako je např. SwissProt) a klamné databáze, ve které byly všechny peptidové sekvence obráceny, promíchány či randomizovány.^{/79,89/} Za předpokladu, že v klamné databázi neočekáváme žádné skutečné identifikace, je možné tvrdit, že pokud pro některé MS/MS spektrum je nejpravděpodobnějším identifikovaným peptidem (překračujícím hranici signifikance) peptid pocházející z klamné části databáze, jedná se o falešně pozitivní identifikaci.^{/89/} Procento FDR je stanoveno dle vzorce:

$$FDR = \frac{2 \times DH}{DH + FH} \times 100\%$$

kde DH je počet identifikací v klamné (decoy) části databáze, FH je počet identifikací ve skutečné (forward) části databáze.^{/89/} V čitateli je $2 \times DH$, jelikož (za předpokladu, že peptidy skutečné a klamné databáze mají stejnou pravděpodobnost identifikace) stejné množství falešně pozitivních identifikací, jaké se vyskytlo v klamné databázi, nastalo i ve skutečné databázi.^{/89/}

2. CÍLE PRÁCE

Primárním cílem této diplomové práce bylo za využití hmotnostně spektrometrických technik proteomicky charakterizovat membránové mikrodomény lidských přirozených zabíječských (NK) buněk. Tento úkol bylo možno rozdělit do několika částí:

- kultivovat a expandovat buňky linie NK-92MI a detergentovou solubilizací izolovat detergentu-rezistentní membrány (DRM),
- proteomicky charakterizovat DRM pomocí techniky LC-MALDI-TOF/TOF,
- srovnat proteinové složení DRM získaných za pomoci různých detergentů,
- srovnat různé postupy zpracování vzorků DRM a jejich proteolýzy.

Je známo, že liniové NK buňky jsou ve své podstatě maligního leukemického původu a částečně se odlišují genotypem, fenotypem a funkčními vlastnostmi od majoritní populace NK buněk přítomných v periferní krvi zdravého dárce. Proto bylo cílem této práce expandovat či separovat lidské NK buňky neleukemického původu a z proteomického hlediska srovnat DRM těchto buněk s DRM buněk linie NK-92MI.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Seznam použitého materiálu a přístrojů

3.1.1. Přístroje a pomůcky

- hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF (UltraFlex III) *Bruker Daltonics, SRN*
- HPLC systém UltiMate s UV detektorem a autosamplerem Famos *Dionex, USA*
- robotický sběrač frakcí Proteineer fc *Bruker Daltonics, SRN*
- HPLC pumpa Prominence LC-20AD *Shimadzu, Japonsko*
- tkáňový box s laminárním prouděním MSC 12 *Jouan, Francie*
- tkáňový inkubátor s CO₂, IGO 150 Cell Life *Jouan, Francie*
- průtokový cytometr LSR II *BD Biosciences, USA*
(v Servisním centru pro cytometrii a mikroskopii MBÚ AV ČR, v.v.i.)
- automatický buněčný separátor RoboSep *StemCell Technologies, Kanada*
(v Laboratoři diagnostiky autoimunitních onemocnění, BTÚ AV ČR, v.v.i.)
- chlazený CCD kamerový systém LAS-3000 *Fujifilm, Japonsko*
(v Laboratoři signální transdukce, ÚMG AV ČR, v.v.i.)
- ortovoltážní rentgenový zdroj T-200 *Wolf-Medizintechnik, SRN*
(v rámci RTG servisního pracoviště ÚMG AV ČR, v.v.i.)
- preparativní ultracentrifuga Optima LE-80K s výkyvným rotorem SW 60 Ti *Beckman, USA*
- centrifuga Z 233 MK-2 s úhlovým rotorem 220.87 VO5/6 *Hermle, SRN*
- centrifuga J-6M s výkyvným rotorem JS-5.2 *Beckman, USA*
- centrifuga PK110 s výkyvným rotorem O-G26 *ALC, USA*
- centrifuga Harrier 15/80 s 4×200ml výkyvným rotorem *MSE, UK*
- stolní centrifuga MiniSpin s úhlovým rotorem F45-12-11 *Eppendorf, SRN*
- stolní centrifuga 5415R s úhlovým rotorem F45-24-11 *Eppendorf, SRN*
- stolní centrifuga Universal 32R s výkyvným rotorem 1624 *Hettich Lab, SRN*
- kolonka Peptide MacroTrap *Michrom Bioresources, USA*
- mikrostříkačky Hamilton 50 – 500 µl *Hamilton, Švýcarsko*
- MALDI deska AnchorChip 800/384 T F *Bruker Daltonics, SRN*
- MALDI adaptér MTP target frame III *Bruker Daltonics, SRN*

- chromatografická kolona s obrácenou fází Magic C18AQ
5 μ 200Å 150mm×0,2mm *Michrom Bioresources, USA*
- automatické pipety *Gilson, Francie / Thermo Scientific, USA*
- pipetovací nástavec Pipettus Akku *Hirschmann – laborgeräte, SRN*
- vortex Wizard *Velp Scientifica, Itálie*
- SpeedVac koncentrátor Savant SPD121P s mrazovým
lapačem par RVT400 *Thermo Scientific, USA*
- sonikátor Sonorex RK52H *Bandelin, SRN*
- sonikátor Elmasonic S30H *Elma, SRN*
- membránový filtr Express PLUS, 0,22 μ m *Millipore, USA*
- analytické váhy ALJ 220-4 *Kern, SRN*
- předvážky PCB 1600-2 *Kern, SRN*
- pH metr Orion2 Star s pH elektrodou Biotrode
Thermo Scientific, USA / Hamilton, Švýcarsko
- inverzní optický mikroskop *Meopta, ČR*
- Bürker-Türkův haemocytometr *Marienfeld, SRN*
- tenkostěnné ultracentrifugační kyvety Ultra-Clear 4 ml *Beckman-Coulter, USA*
- blokový ohřívač BTD *Grant Instruments, UK*
- zdroj napětí PowerPac Universal *Bio-Rad, USA*
- aparatura na vertikální gelovou elektroforezu Mighty Small *Hoefer, USA*
- přenosová jednotka pro elektropřenos Semi-Phor *Hoefer, USA*
- nitrocelulosová membrána BioTrace NT *Pall, USA*
- filtrační papír 3mm *Whatman, UK*
- vodní lázeň WB10 *Memmert, SRN*
- třepačka Boekel BFR 25 *Grant, UK*
- univerzální indikátorové papírky *Lachner, ČR*
- hlubokomrazicí box -150 °C MDF-C2156 VAN *Sanyo, Japonsko*
- hlubokomrazicí box -80 °C C585-86 *New Brunswick Scientific, USA*
- hlubokomrazicí box -75 °C VXE 380 *Jouan, Francie*
- mrazicí kontejner (-1 °C/min) Mr. Frosty s isopropanolem *Nalgene, USA*
- plastové tkáňové kultivační lahve 25 – 150 cm² *Corning, USA*

- jednorázové plastové sérologické pipety 5 – 25 ml *Corning, USA*
- plastové zkumavky typu Falcon 15 a 50 ml, špičky na pipety,
mikrozkumavky, plastové kultivační Petriho misky Ø 6 a 10 cm,
kryozkumavky 1,2 ml *TPP, Švýcarsko*
- polystyrenové zkumavky Falcon Tube 17×100 mm s kulatým dnem
BD Biosciences, USA
- 24-jamkové kultivační destičky *TPP, Švýcarsko*
- filtry na buněčné suspenze CellTrics, nylon mesh 30 µm *Partec, SRN*
- jednorázová pouzdra s pipetovacími špičkami RoboSep
StemCell Technologies, Kanada
- jednorázové injekční stříkačky BD Plastipak 1 a 2 ml *BD Medical, Francie*
- jednorázové injekční jehly Medoject 25G (Gauge) *Chirana T. Injecta, SR*
- jednorázové hypodermické injekční stříkačky 29G (Gauge)
BD MicroFine PLUS *BD Medical, Francie*
- jednorázové filtry Puradisc 25 PP, 0,2 µm *Whatman, USA*
- 250 µl polypropylenové vialky pro autosampler
s PTFE/silikonovým septem *Agilent Technologies, USA*

3.1.2. Chemikálie

- β-merkapt ethanol, pro tkáňové kultury *Sigma, USA*
- DMSO, pro tkáňové kultury *Sigma, USA*
- Lymphoprep *Axis-Shield, Norsko*
- Mitomycin C *Kyowa, UK*
- Heparin, 5000 IU/ml *Léčiva, ČR*
- separační kity EasySep #19055 („human negative selection NK cell enrichment kit“)
StemCell Technologies, Kanada
- 10 µg/ml barvicí roztok propidium jodidu *BD Biosciences, USA*
- sacharosa, research grade *Jersey Lab Supply, USA*
- Complete – směs inhibitorů proteas *Roche, Švýcarsko*
- 10% neionogenní detergent Surfact-Amps (Triton) X-100 *Thermo Scientific, USA*
- 10% neionogenní detergent Brij-98 *Sigma-Aldrich, USA*
- 10% roztok SDS *Bio-Rad, USA*

• 30% (v/v) akrylamid:N,N'-methylen-bis-akrylamid (29:1)	<i>Bio-Rad, USA</i>
• APS	<i>Bio-Rad, USA</i>
• TEMED	<i>Bio-Rad, USA</i>
• hovězí sérový albumin, frakce V	<i>Serva, SRN</i>
• sušené odtučněné mléko	<i>Sigma, USA</i>
• neionogenní detergent Tween-20	<i>Sigma, USA</i>
• p-kumarová kyselina	<i>Fluka, SRN</i>
• luminol	<i>Fluka, SRN</i>
• 30% H ₂ O ₂	<i>Merck, SRN</i>
• chemiluminiscenční substrát SuperSignal West Femto	<i>Thermo Scientific, USA</i>
• aceton, p.a.	<i>Merck, SRN</i>
• methanol, p.a.	<i>Lachner, ČR</i>
• ethanol, p.a.	<i>Lachner, ČR</i>
• ethanol denaturovaný	
• diethylether, p.a.	<i>Merck, SRN</i>
• chloroform, bezv. Lichrosolv	<i>Merck, SRN</i>
• kyselina octová, p.a.	<i>Lachner, ČR</i>
• bromkyan, reagent grade	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• acetonitril, Lichrosolv LC-MS hypergrade	<i>Merck, SRN</i>
• H ₂ O, LC-MS hypergrade Lichrosolv	<i>Merck, SRN</i>
• Coomassie Brilliant Blue	<i>Fluka, SRN</i>
• formaldehyd ≥ 37%, p.a.	<i>Fluka, SRN</i>
• thiosíran sodný pentahydrát, p.a.	<i>Sigma, USA</i>
• dusičnan stříbrný, p.a.	<i>Fluka, SRN</i>
• uhličitan sodný monohydrát, p.a.	<i>Fluka, SRN</i>
• EDTA-Na ₂ monohydrát, p.a.	<i>Fluka, SRN</i>
• trifluoroctová kyselina	<i>Sigma, USA</i>
• kyselina mravenčí	<i>Sigma, USA</i>
• kyselina p-hydroxy- α -kyanoskořicová, MS grade	<i>Bruker Daltonics, SRN</i>
• MALDI peptidový kalibrační standard II	<i>Bruker Daltonics, SRN</i>

- helium 4,6 (>99,996%) pro odvězdušňování solventů *Messer, ČR*
- kapalný dusík *Messer, ČR*
- *ostatní chemikálie čistoty p.a. či research grade*

3.1.3. Bioreagencie

- konjugovaná protilátka mouse-anti-human CD3-AlexaFluor450 *eBioscience, USA*
- konjugovaná protilátka mouse-anti-human CD56-PECy7 *Immunotech, ČR*
- protilátka mouse(IgM)-anti-human α -tubulin *ExBio, ČR*
- protilátka mouse(IgG1)-anti-human Lck *ExBio, ČR*
- konjugovaná protilátka goat-anti-mouse(IgM)-HRP *Santa Cruz Biotechnologies, USA*
- konjugovaná protilátka goat-anti-mouse(IgG)-HRP *Bio-Rad, USA*
- rekombinantní lidský IL-2 (interleukin-2) *Peprtech, USA*
- Trypsin Gold, MS grade *Promega, USA*
- proteinový standard pro elektroforesu SeeBlue *InVitrogen, USA*

3.1.4. Média

- RoboSep pufr *StemCell Technologies, Kanada*
- 1× PBS pufr pH 7,2 *přípravna médií ÚMG AV ČR*
- DMEM médium na promytí buněk: 250 ml 2× DMEM, 5 ml 10000 U/ml penicilin G + 10 mg/ml streptomycin, 10 ml 7,5% NaHCO₃, 5 ml 1M HEPES pH 7,2, doplněno sterilní destilovanou vodou na objem 500 ml.
- RPMI-1640 médium pro PBMC: 100 ml 5× RPMI-1640, 10 ml 200mM L-glutamin, 5 ml 10000 U/ml penicilin G + 10 mg/ml streptomycin, 10 ml 7,5% NaHCO₃, 5 ml 25% glukosa, 5 ml 1,1% pyruvát sodný, 5 ml 1M HEPES pH 7,2, 25 ml FBS, doplněno sterilní destilovanou vodou na objem 500 ml.
- RPMI-1640 médium pro expansi NK buněk: stejné složení jako RPMI-1640 médium pro PBMC, pouze obsahuje 50 ml FBS (tj. celková výsledná koncentrace FBS 10 %).

- RPMI-1640 pro K562: 200 ml 5× RPMI-1640, 20 ml 200mM L-glutamin, 10 ml 10000 U/ml penicilin G + 10 mg/ml streptomycin, 20 ml 7,5% NaHCO₃, 10 ml 1M HEPES pH 7,2, 100 ml FBS, doplněno sterilní destilovanou vodou na objem 500ml.
- α-MEM médium pro NK-92MI: 700 ml Alpha MEM Eagle, 10 ml 200mM L-glutamin, 10 ml 10000 U/ml penicilin G + 10 mg/ml streptomycin, 20 ml 7,5% NaHCO₃, 1 ml 200mM myo-inositol, 4 ml 25mM β-merkapt ethanol, 1 ml 20mM kyselina listová v 1M NaOH, 125 ml FBS, 125 ml HS, 200 IU/ml IL-2.
- α-MEM SPECIÁL médium: 200 ml 5× α-MEM, 10 ml 200mM L-glutamin, 1 ml 20mM kyselina listová v 1M NaOH, 4 ml 0,35% (v/v) vodný roztok β-merkapt ethanolu, 2 ml 31% gentamicin sulfát, 1ml 2,5 mg/ml fungison, 1 ml 200mM myo-inositol, 5 ml 7,5% NaHCO₃, 100 ml FBS, 100 ml HS, doplněno sterilní deionizovanou vodou na objem 1000 ml.
- HMEM-d s heparinem: 100 ml 10× HMEM-d, 2 ml 31% gentamicin sulfát, 5 ml 1M HEPES pH 7,2, 50 ml FBS, 5 ml 7,5% NaHCO₃, 1 ml heparin, doplněno sterilní deionizovanou vodou na objem 1000 ml.
- Médium pro mražení buněk: 10% DMSO, 50% FBS, 40% kompletní médium použité pro kultivaci daného typu buněk.

Výchozí roztoky látek z přípravy médií ÚMG AV ČR mimo FBS a HS (Gibco - InVitrogen, USA), gentamicin, thiamulin, fungison, β-merkapt ethanol, kyselinu listovou, myo-inositol, DMSO (vše pro tkáňové kultury; Sigma, USA), HEPES (Sigma, USA) a Alpha MEM Eagle (Lonza, Švýcarsko).

3.1.5. Pufry a solventy

- Türkův roztok: dva krystalky krystalové violeti ve 45 ml 1% kyseliny octové.
- ACK pH 7,4: 1,55M NH₄Cl, 0,1M KHCO₃, 12,73mM EDTA, pH upraveno na 7,4.
- Hypotonický pufr: 10mM HEPES pH 7,4, 42mM KCl, 5mM MgCl₂; těsně před použitím přidáno na 1 ml pufru 40 µl 25× roztoku inhibitorů proteas Complete.
- TNE: 20mM Tris-Cl pH 8,2, 150mM NaCl, 10mM EDTA; těsně před použitím přidáno na 1 ml pufru 40 µl 25× roztoku inhibitorů proteas Complete.
- Lytický pufr: 1% detergent (Triton X-100 nebo Brij-98) v TNE s inhibitory proteas.

- 2× vzorkový pufr pro SDS-PAGE: 100mM Tris-Cl pH 6,8, 4% SDS, bromfenolová modř, 20% glycerol; pro elektroforesu v redukujícím prostředí navíc s 5% β -merkaptoethanolem.
- 10× TGS (Tris-glycin-SDS) elektrodový pufr *Bio-Rad, USA*
- Coomassie Brilliant Blue barvicí roztok pro SDS-PAGE gely: 1,25 g CBB-R250, 450 ml H₂O, 50 ml EtOH.
- odbarvovací roztok pro SDS-PAGE gely: 10% AcOH, 35% EtOH, 55% H₂O.
- fixační roztok pro barvení gelů stříbrem: 50% MeOH, 10% kyselina octová, před použitím přidáno 25 μ l 37% formaldehydu na 50 ml roztoku.
- impregnační roztok pro barvení gelů stříbrem: 0,1 g AgNO₃ v 50 ml H₂O, bezprostředně před použitím přidáno 37,5 μ l 37% formaldehydu.
- vyvolávací roztok pro barvení gelů stříbrem: 3 g Na₂CO₃·H₂O v 50 ml H₂O, bezprostředně před použitím přidáno 25 μ l 37% formaldehydu a 100 μ l 0,2% roztoku Na₂S₂O₃.
- přenosový pufr pro elektropřenos: 192mM glycín, 25mM Tris v MeOH:H₂O (1:4).
- TBS pH 7,6: 20mM Tris-Cl pH 7,6, 137mM NaCl, 0,05% Tween-20.
- ECL-A: 2,5mM luminol (rozpuštěn v malém množství DMSO) v 0,1M Tris-Cl pH 8,8, 90mM p-kumarová kyselina (rozpuštěna v malém množství DMSO).
- ECL-B: 5,4mM H₂O₂ v 0,1M Tris-Cl pH 8,8.
- čisticí roztok na MacroTrap (z LC-MS hypergrade solventů): 10% H₂O, 10% FA, ACN:iPrOH:MeOH (1:1:1)
- solvent A pro chromatografii na obrácené fázi (z LC-MS hypergrade solventů): 1% ACN, 0,1% TFA; odplyněn sonikací pod vakuem pod membránovým filtrem Express PLUS, 0,22 μ m.
- solvent B pro chromatografii na obrácené fázi (z LC-MS hypergrade solventů): 95% ACN, 0,08% TFA; odplyněn sonikací pod vakuem pod membránovým filtrem Express PLUS, 0,22 μ m.
- HCCA matrice pro LC-MALDI-MS (z LC-MS hypergrade solventů): 1496 μ l ACN, 16 μ l 10% TFA, 16 μ l 100mM NH₄H₂PO₄ v 0,1% TFA, 72 μ l nasyceného roztoku HCCA v TA90 (90% ACN, 0,1% TFA).

3.1.6. Biologický materiál

- lidská buněčná linie NK-92MI (ATCC – CRL-2408)
- lidská buněčná linie RPMI-8866
- lidská buněčná linie K562 (ATCC – CCL-243)
- lidská stabilně transdukováná buněčná linie K562-mb15-41BBL

Buněčná linie laskavě poskytnuta Dr. Campanou ze St. Jude Children's Research Hospital, USA.

- lidský krevní derivát tzv. „buffy coat“ – tj. cca 50 ml čerstvé nabohacené lymfocytární frakce získané z cca 450 ml plné krve odebrané neleukemickému lidskému dárci

Krevní deriváty laskavě poskytnuty transfuzním oddělením Fakultní Thomayerovy nemocnice v Krči.

3.1.7. Programové vybavení

- | | |
|--|------------------------------|
| • flexAnalysis 1.3, v3.3 | <i>Bruker Daltonics, SRN</i> |
| • Data Analysis 4.0 SP3 | <i>Bruker Daltonics, SRN</i> |
| • flexControl 1.3, v3.3 | <i>Bruker Daltonics, SRN</i> |
| • WARP-LC v1.2 | <i>Bruker Daltonics, SRN</i> |
| • BioTools v3.1 | <i>Bruker Daltonics, SRN</i> |
| • Mascot ver. 2.2.04 in-house server s databází SwissProt
(SProt_2012.fasta aktuální k 21.3.2012) | <i>Matrix Science, UK</i> |
| • FlowJo v9.2 | <i>Tree Star, USA</i> |
| • mMass v5.0.0 | <i>Martin Strohalm, ČR</i> |

3.2. Experimentální metody

3.2.1. Kultivace buněčných linií

Alikvoty buněčných linií (5×10^6 buněk v 1 ml média pro mražení buněk), dlouhodobě uchovávané při -150°C , byly rychle rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 37°C . Pro odstranění toxického DMSO byly buňky neprodleně promyty 10 ml příslušného kultivačního média s centrifugací na centrifuze ALC PK-110 s rotorem ALC O-G26 při 1100 rpm a laboratorní teplotě po dobu 5 min. Buňky byly resuspendovány do 10 ml kultivačního média a na 10cm Petriho misce kultivovány při 37°C a 5 % CO_2 . S postupným přidáváním kultivačního média při expansi byla kultura přenesena do 75 cm^2 , potažmo 150 cm^2 tkáňových kultivačních lahví s prodyšným víčkem.

Buněčná kultura **NK-92MI** byla kultivována v médiu αMEM pro NK-92MI s 200 IU/ml IL-2. Čerstvým médiem byla kultura ředěna každý druhý den v poměru 1:2 (dva díly čerstvého média na jeden díl kultury), před víkendem byla kultura ředěna v poměru 1:3 a ponechána kultivovat 3 dny. Buňky byly kultivovány suspenzně v kompaktních buněčných shlucích, tvořených viabilními buňkami. Tyto shluky byly při ředění kultury šetrně rozrušeny pipetováním suspenze po stěně kultivační nádoby. Při sklizení buněk pro izolaci membrán byly kultivační lahve postaveny na boční stěnu, buněčné shluky byly ponechány sedimentovat a pipetou bylo opatrně sebráno kultivační médium nad sedimentovanými buňkami. Zakoncentrovaná buněčná kultura byla následně centrifugována na centrifuze ALC PK-110 s rotorem ALC O-G26 při 1100 rpm po dobu 3 minut, promyta $2 \times \text{PBS}$ a resuspendována do 40 ml PBS. Buňky byly po obarvení alikvotu Türkovým roztokem sečteny v Bürker-Türkově haemocytometru a dále použity pro izolaci detergent-rezistentních membránových mikrodomén (viz část 3.2.6 této práce).

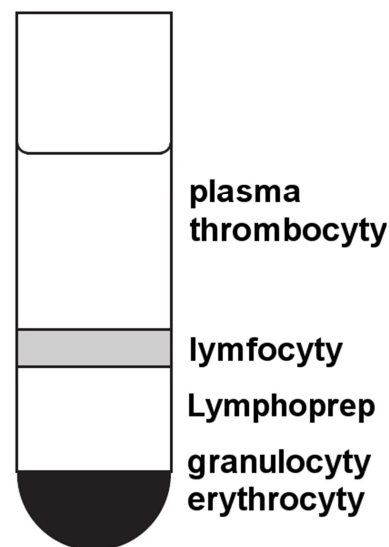
Buňky linií **RPMI-8866**, **K562** a z ní derivované stabilně transdukované linie **K562-mb15-41BBL** byly kultivovány v médiu RPMI-1640 pro K562 či αMEM SPECIÁL. Suspenzní kultura (netvořící shluky) byla expandována ředěním čerstvým médiem v poměru 1:2 respektive 1:3 každé 2 až 3 dny, obdobně jako u NK-92MI. Buněčná hustota kultury byla udržována okolo hodnoty 5×10^5 buněk/ml. Pro využití při pokusech o expansi NK buněk (viz část 3.2.3 této práce) byly buňky centrifugovány při 1100 rpm po dobu 3 minut na centrifuze ALC PK-110 s rotorem ALC O-G26 a resuspendovány do požadovaného pufu/média.

3.2.2. Izolace mononukleárních buněk z lidské periferní krve (PBMC)

Izolace provedena dle upraveného protokolu dle Böyuma.^{/90/}

Z odběrového vaku obsahujícího cca 50 ml nabohacené krevní lymfocytární frakce (tzv. „buffy coat“), získané od neleukemického lidského dárce, byl injekční stříkačkou s jehlou o tloušťce 25G odebrán 200 μ l alikvot krve. V tomto alikvotu byly s využitím techniky průtokové cytometrie (viz část 3.2.5 této práce) lymfocyty daného dárce otestovány na procentuální zastoupení NK buněk. Pro další práci byla využita pouze krev od dárců majících mezi lymfocyty alespoň cca 10 % NK buněk.

Buffy-coat od vhodného dárce byl zředěn na objem 140 ml HMEM-d médiem s heparinem či kompletním RPMI-1640 médiem pro PBMC a ošetřen proti srážení přídávkem 140 μ l heparinu. Takto heparinizovaná krev byla v objemu 35 ml navrstvena v 50 ml zkumavkách typu Falcon na 15 ml izolačního média Lymphoprep. Buněčná frakce obsahující převážně mononukleární lymfocyty^{/90/} byla sebrána z rozhraní Lymphoprep média a krevní plasmy (Obr. 14), utvořeného po centrifugaci na centrifuze Beckman J-6M s výkyvným rotorem JS-5.2 trvající 22 minut při 1540 rpm a 22 °C, s akcelerací 5 a decelerací 7. Buňky byly následně dvakrát promyty DMEM médiem s centrifugací na centrifuze ALC PK-110 s výkyvným rotorem ALC O-G26 při laboratorní teplotě. Nejprve pro odstranění zbytků densitního média Lymphoprep při 3000 rpm po dobu 10 min a následně pro odstranění kontaminujících trombocytů při 1100 rpm po dobu 20 min. Po resuspendaci do kompletního RPMI-1640 média pro PBMC byly buňky spočítány v Bürker-Türkově haemocytometru s využitím barvení pomocí Türkova roztoku. Buněčná suspenze byla naředěna na koncentraci 5×10^6 buněk/ml RPMI-1640 médiem pro PBMC (pro imunomagnetickou separaci NK buněk s 200 IU/ml IL-2) a ve 150 cm² tkáňové kultivační lahvi s prodyšným víčkem ponechána v klidu přes noc v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂.



Obr. 14: Izolace PBMC na densitním médiu Lymphoprep. Po centrifugaci antikoagulované krve navrstvené na médiu Lymphoprep byla převážně lymfocytární frakce PBMC izolována ze zřetelného rozhraní.

3.2.3. Expansní protokoly pro NK buňky

Ozařování buněčných suspenzí rentgenovým zářením bylo provedeno p. Romanem Liškou ze servisního RTG pracoviště ÚMG AV ČR.

Cílové buňky linií K562-mb15-41BBL, K562 a RPMI-8866 byly kultivovány v médiu RPMI-1640 pro K562 či α MEM SPECIÁL (viz část 3.2.1 této práce). Pro zamezení dalšího růstu a dělení buněk byla zakoncentrovaná buněčná suspenze na 6cm Petriho misce či v 25 cm² tkáňové lahvi ozářena měkkým rentgenovým zářením na ortovoltážním rentgenovém zdroji T-200 (200 kV, 13 mA, 0,3 mm hliníkový filtr). Ozařovací dávka činila 100 Gy v průběhu 6 minut, případně 50 Gy v průběhu 20 minut. Alternativně k ozařování byla buněčná suspenze inkubována s mitomycinem C po dobu 30 minut při 37 °C (25×10^6 buněk/ml, výsledná koncentrace mitomycinu 50 μ g/ml média). Po inkubaci byly buňky 4 \times promyty kultivačním médiem bez mitomycinu s centrifugací na centrifuze MSE Harrier 15/80 s 4 \times 200ml výkyvným rotorem po dobu 5 minut při 1200 rpm za laboratorní teploty.

Cílové nádorové buňky (K562-mb15-41BBL, K562 i RPMI-8866) po ozáření dávkou 50 Gy/20 min či inkubaci s mitomycinem (3×10^6 buněk) byly společně s PBMC (12×10^6 buněk) izolovanými z krve neleukemických lidských dárců (viz část 3.2.3 této práce) resuspendovány do 24 ml média α MEM SPECIÁL či RPMI pro expansi NK buněk. Buňky byly kokultivovány na 24-jamkové kultivační destičce (1 ml suspenze na jamku) při 37 °C a 5 % CO₂. Po 3 a 6 dnech bylo do každé jamky přidáno 0,5 ml čerstvého média a suspenze byla promíchána.

Alternativně byly cílové buňky K562-mb15-41BBL, ozářené dávkou 100 Gy/6 min, kokultivovány v poměru 1:1,5 s PBMC z krve neleukemických lidských dárců (1×10^6 buněk/ml cílových buněk, $1,5 \times 10^6$ buněk/ml PBMC) či v poměru 10:1 s CD56⁺/CD3⁻ NK buňkami separovanými na přístroji RoboSep (viz část 3.2.4 této práce). Inkubace probíhala při 37 °C a 5 % CO₂ v médiu RPMI pro expansi NK buněk s přidavkem 10 IU/ml IL-2. Po 2 a 5 dnech kultivace byla kultura zředěna 1:1 přidavkem čerstvého média.

3.2.4. Imunomagnetická izolace NK buněk z PBMC

Separace NK buněk na separátoru RoboSep byla prováděna v Laboratoři diagnostiky autoimunitních onemocnění, BTÚ AV ČR, v.v.i.

Kultivované PBMC (viz část 3.2.2 této práce) byly po odstranění adherentní buněčné frakce dvakrát promyty PBS médiem s centrifugací na centrifuze ALC PK-110 s rotorem

ALC O-G26 při 1500 rpm a laboratorní teplotě po dobu 5 min. Mezi promytími byly buňky spočítány v Bürker-Türkovi haemocytometru s využitím barvení Türkovým roztokem. Po promytí byly buňky velmi důkladně resuspendovány v PBS médiu na objem 8 ml a z buněčné suspenze byl odebrán 500 µl alikvot pro průtokovou cytometrii (viz část 3.2.5 této práce), který byl až do analýzy uchováván v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. Zbýlá buněčná suspenze v PBS byla pro odstranění případných nedokonale resuspendovaných buněčných shluků filtrována přes filtr CellTrics (nylon mesh 30 µm). Z buněčné suspenze byly bez dalšího ředění pomocí komerčního kitu EasySep #19055 (human NK cell enrichment kit) dle návodu výrobce^{/40/} na automatickém buněčném separátoru RoboSep odděleny NK buňky negativní imunomagnetickou selekcí. Buňky po separaci byly centrifugovány při 1500 rpm po dobu 5 min na centrifuze ALC pro odmytí RoboSep pufru a resuspendovány do objemu 5 ml média RPMI-1640 pro PBMC s 50 IU/ml IL-2. Po spočítání v Bürker-Türkovi haemocytometru byly buňky naředěny na koncentraci 5×10⁶ buněk/ml a byl odebrán alikvot obsahující 1×10⁶ buněk pro průtokovou cytometrii. Suspenze separovaných NK buněk byla do izolace mikrodomén (cca 1 – 2 hodiny) ponechána v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂.

3.2.5. Průtoková cytometrie

Lyze erythrocytů, povrchové značení a měření na průtokovém cytometru byly provedeny RNDr. Janem Svobodou a Mgr. Žanetou Růžickovou ze Servisního centra pro cytometrii a mikroskopii MBÚ AV ČR, v.v.i.

Alikvoty krve o objemu 200 µl z „buffy-coatů“ byly 4× zředěny PBS a centrifugovány na centrifuze Hettich Universal 32R s výkyvným rotorem 1624 při 1800 rpm a 4 °C po dobu 2 minut. Po odsátí supernatantu byly erythrocyty lyzovány resuspendací a inkubací v 800 µl ACK pufru při laboratorní teplotě po dobu asi 10 minut do zprůhlednění roztoku. Buňky byly 2× či 3× promyty PBS s centrifugací při 1800 rpm po dobu 2 min. Pokud ani při třetím promytí nebyl supernatant čirý, byla lyze v ACK opakována s dobou inkubace 5 min.

Buňky z krve po lyzi erythrocytů, alikvoty kultivovaných PBMC či separované NK buňky z RoboSepu byly promyty 200 µl PBS s centrifugací na centrifuze Hettich Universal 32R s rotorem 1624 při 1800 rpm a 4 °C po dobu 2 min. K buněčné suspenzi bylo přidáno 10 µl směsi konjugovaných protilátek mouse-anti-human CD3-AlexaFluor450 (ředěna 1:25) s mouse-anti-human CD56-PECy7 (ředěna 1:50) a buňky byly ponechány inkubovat 30 min ve tmě při 4 °C. Po inkubaci byly buňky promyty

1 ml PBS, resuspendovány do 300 μ l PBS a těsně před měřením na průtokovém cytometru LSR II byl k suspenzím přidán roztok propidium jodidu na výslednou koncentraci 1 μ g/ml. Data byla sbírána do 50000 událostí v singletové viabilní (PI) lymfocytární oblasti (anglicky „gate“) a podíl NK buněk mezi lymfocyty ve vzorku byl určen jako procento CD56⁺/CD3⁻ buněk při vyhodnocení v programu FlowJo v9.2.

3.2.6. Izolace detergent-rezistentních membránových mikrodomén (DRM)

Izolace detergent-rezistentních membrán byla provedena dle upraveného protokolu dle Mana et al.^{/57/}

Suspenze buněk (liniových NK-92MI – část 3.2.1 či imunomagneticky separovaných NK buněk z krve neleukemických lidských dárců – část 3.2.4 této práce) byla centrifugována na centrifuze ALC PK110 s rotorem O-G26 při 1500 rpm po dobu 5 minut. Buněčná peleta byla na ledu důkladně resuspendována ve studeném hypotonickém pufru s 1 \times inhibitory proteas Complete (1 ml hypotonického pufru na 1 \times 10⁸ buněk; u separovaných NK buněk minimálně 0,4 ml) a suspenze byla ponechána inkubovat na ledu 30 minut. Následně byly buňky v suspenzi za chladu rozbity 30 \times opakovaným protahováním skrz injekční jehlu o tloušťce 25G, následovaným 10 \times protažením skrz jehlu o tloušťce 29G (NK-92MI); respektive 10 \times protažením jehlou 25G a 30 \times jehlou 29G (NK buňky separované z krve). Suspenze byla v mikrozkuřkách centrifugována na centrifuze Hermle Z233 MK-2 s úhlovým rotorem 220.87 VO5/6 při 2300 rpm a 4 °C po dobu 4 minut. Peleta obsahující buněčné organelly a celé buňky byla uschována na gelovou elektroforesu (v případě NK buněk separovaných z krve byla podruhé podrobena lyzi v hypotonickém pufru a rozbíjení buněk), zatímco odebraný supernatant byl centrifugován při 15000 rpm a 4 °C po dobu 15 minut. Supernatant (cytosolární frakce) po vysokorychlostní centrifugaci byl uschován na gelovou elektroforesu a peleta membránové frakce byla resuspendována v 0,6 ml lytického pufru (v případě separovaných NK buněk byly 2 membránové pelety při resuspendaci spojeny). Resuspendované membrány byly lyzovány na ledu po dobu 30 minut.

Roztok s lyzovanými membránami byl smíchán s 0,6 ml 90% sacharosy v TNE (s nebo bez inhibitorů proteas). Na 1 ml takto vzniklého vzorku ve 45% roztoku sacharosy byl v Ultra-Clear ultracentrifugační kyvetě po 1 ml opatrně navrstven diskontinuální sacharový gradient o koncentracích 30 %, 15 % a 0 % sacharosy v TNE (s nebo bez inhibitorů proteas). Vzorek v gradientu byl centrifugován na preparativní ultracentrifuze Optima LE-80K s výkyvným rotorem SW 60 Ti při 50000 rpm a 4 °C,

s maximální akcelerací a bez aktivního brzdění po dobu 17 – 18 hodin. Gradient byl posléze shora za chladu rozebrán na frakce po 0,5 ml a z každé bylo odebráno 50 μ l na SDS elektroforesu a elektropřenos s imunodetekcí proteinů (části 3.2.7 a 3.2.8 této práce). Vzorky pro hmotnostní spektrometrii byly následně ihned zpracovány dle části 3.2.9 této práce (NK-92MI) či šokově zmrazeny v kapalném dusíku a do další práce uchovávány při -75 °C (separované NK buňky).

3.2.7. SDS-PAGE (diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforesa v prostředí SDS)

Alikvoty vzorků pro polyakrylamidovou gelovou elektroforesu (viz část 3.2.6 této práce) byly smíchány (1:1) s 2 \times vzorkovým pufrem pro SDS-PAGE (pro následnou imunodetekci α -tubulinu obsahujícím 5% β -merkaptoethanol). U separovaných NK buněk od neleukemických dárců byl připraven směsný vzorek smísením alikvotů jednotlivých gradientových frakcí (se stejnými podmínkami izolace DRM) mezi různými dárci. V případě imunodetekce tubulinu a vždy v případě jaderné/celobuněčné pelety byly vzorky zahřáty na 98 °C po dobu 5 minut. Vzorky byly v objemu 30 μ l (vzorky z buněčné linie NK 92MI) nebo 50 μ l (vzorky z NK buněk neleukemických dárců) naneseny do jamek na 1,5 mm tlustý 10% separační polyakrylamidový gel s 5% zaostřovacím gelem, které byly připraveny dle upraveného protokolu^{/91/} (Tab. 2).

Tab. 2: Složení roztoků pro přípravu SDS-PAGE gelů. Upraveno z /91/.

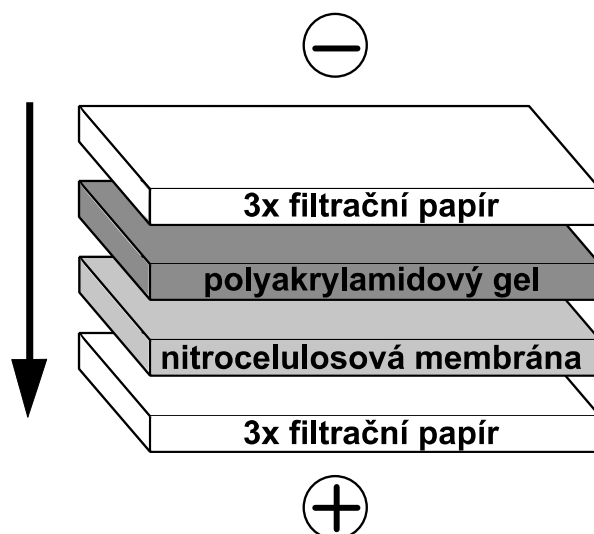
	10% separační gel [ml]	5% zaostřovací gel [ml]
H ₂ O	4,0	2,1
30% akrylamid:bisakrylamid mix	3,3	0,5
1,5M Tris-Cl, pH 8.8	2,5	-
0,5M Tris-Cl, pH 6.8	-	0,38
10% SDS	0,1	0,03
10% APS	0,1	0,03
TEMED	0,004	0,003

Společně se vzorky byl na gel nanesen i proteinový standard SeeBlue v objemu 7,5 μ l. Elektroforesa probíhala s 1 \times TGS coby elektrodovým pufrem při konstantním proudu 30 mA (na jeden gel) po dobu asi 60 – 75 minut (dle postupu barevného čela vzorku). Po skončení elektroforesy byly proteiny v gelu vizualizovány barvením roztokem Coomassie Brilliant Blue R250 po dobu 25 minut a následným částečným odbarvením pomocí odbarvovacího roztoku, případně dále zpracovány technikou elektropřenosu s imunodetekcí proteinů (viz část 3.2.8 této práce).

Pro vizualizaci proteinového složení frakcí gradientu s nízkou hustotou, byly alternativně proteiny v gelu vizualizovány barvením stříbrem. Polyakrylamidový dělicí gel byl přes noc ponechán inkubovat za laboratorní teploty v 50 ml fixačního roztoku. Následující den byl gel za mírného míchání na třepačce Grant Boekel BFR 25 inkubován 3×5 minut v 50 ml 50% EtOH a následně 1 minutu v 50 ml 0,2% roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Gel byl opláchnut 3×20 sekund destilovanou vodou a inkubován po dobu 20 minut za mírného míchání při pokojové teplotě v 50 ml impregnačního roztoku. Posléze byl po opláchnutí gelu destilovanou vodou 2×20 sekund přidán ke gelu vyvolávací roztok. Po cca 5 minutách inkubace (dle intensity zbarvení vizualizovaných proteinových zón v gelu), byl vyvolávací roztok rychle odmyt opláchnutím gelu 2×50 ml destilované vody a vyvolávací reakce byla zastavena přidávkem 50 ml 1,5% roztoku EDTA ke gelu.

3.2.8. Elektropřenos a imunodetekce proteinů

Z polyakrylamidových gelů (část 3.2.7 této práce) byla odstraněna zaostřovací část s jamkami pro vzorky. Zbývajících, 8×5,5 cm velký, dělicí gel obsahující elektroforeticky rozdělené proteiny byl spolu s 8,5×6 cm velkými, předem důkladně přenosovým pufrům nasáklými, pruhy filtračního papíru a nitrocelulosové membrány sestaven do tzv. „přenosového sendviče“ (viz Obr. 15). Tento přenosový sendvič byl vložen mezi navlhčené elektrody jednotky Semi-Phor pro polosuchý elektropřenos tak, aby nitrocelulosová membrána byla blíže k anodě. Elektropřenos proteinů z gelu na membránu probíhal při konstantní proudové hustotě 1,47 mA/cm² po dobu 2 hodin.



Obr. 15: Přenosový sendvič pro elektropřenos proteinů. Směr přenosu proteinů je označen šipkou. Pro zajištění vodivosti byly vrstvy filtračního papíru nasáklé pufrům.

Po skončení elektropřenosu byla membrána nesoucí na svém povrchu přenesené proteiny opatrně opláchnuta 10 ml 1× TBS-T pufru a za stálého šetrného míchání blokována po dobu 1 hodiny v 10 ml 5% odtučněného sušeného mléka rekonstituovaného v 1× TBS-T. V mezičase byla blokována primární protilátka (mouse(IgG1)-anti-human Lck – ředěná 1:500 či mouse(IgM)-anti-human α -tubulin – ředěná 1:1000) v 10 ml 5% mléka v TBS-T (anti-tubulin) či v 10 ml 5% BSA v TBS-T (anti-Lck). Po opláchnutí

membrány 10 ml TBS-T byla membrána inkubována s roztokem primární protilátky při 4 °C přes noc. Následující den byla membrána omyta 3×10 min v 10 ml TBS-T a inkubována za šetrného míchání 45 minut při laboratorní teplotě v roztoku 1% sušeného mléka/TBS-T a příslušné (anti-IgG či anti-IgM) sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidasou (GAM-HRP). Po inkubaci byla membrána velmi šetrně omyta 3×5 min v 10 ml TBS-T.

Membrána byla několik sekund inkubována ve 20 ml roztoku vzniklého smícháním roztoků ECL-A a ECL-B v poměru 1:1 a chemiluminiscence luminolu byla snímána chlazenou CCD kamerou LAS-3000 s nastavením dle tabulky (Tab. 3). V případě málo intenzivních signálů byla chemiluminiscence detekována s použitím 1 ml ECL substrátu SuperSignal West Femto.

Tab. 3: Parametry CCD kamery LAS-3000 pro chemiluminiscenční imunodetekci proteinů po elektropřenosu.

	ECL	West Femto	Brightfield
Method:	Chemiluminiscence		Digitize - EPI
Tray position:	1 (uppermost)		1
Filter:	Through		Through
Light:	None		White
Experiment type:	Increment – 10 sec		Precision – 1/100 sec
CCD sensitivity:	Super / High	High / Standard	High

Pozn.: Sloupce ECL a West Femto udávají parametry při použití klasického chemiluminiscenčního substrátu (ECL) a vysoce citlivého substrátu SuperSignal West Femto. Sloupec Brightfield udává parametry pro fotografii membrány v bílém světle.

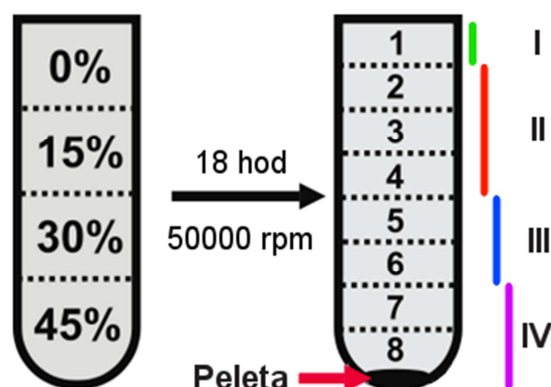
3.2.9. Chemické a enzymatické štěpení proteinů

Štěpení proteinů provedeno dle upraveného protokolu dle Mana et al.^{/57/}

K frakcím sacharosového **gradientu s inhibitory proteas** (viz část 3.2.6 této práce) byl přidán vymražený aceton do výsledné koncentrace 70 % a vzorky byly ponechány precipitovat při -20 °C přes noc. Následně byly vzorky centrifugovány na stolní centrifuze Eppendorf 5415R s úhlovým rotorem F45-24-11 při 13200 rpm a 4 °C po dobu 15 minut. Ze zkumavek byl odebrán supernatant a precipitát byl s centrifugacemi při 13200 rpm po dobu 15 min postupně promyt 200 µl vymraženého acetonu, 200 µl CHCl₃:MeOH (2:1) a 200 µl EtOH:Et₂O (1:1). Pelety byly rozpuštěny v 70% TFA a frakce smíchány dle schématu (Obr. 16, str. 57). Ke směsným frakcím byl v poměru 1:1 přidán roztok CNBr v 70% TFA do výsledné koncentrace CNBr 20 mg/ml, vzorky byly sonikovány 10 minut a ponechány inkubovat bez přístupu světla přes noc při laboratorní teplotě. Druhý

den byly vzorky vysušeny na koncentrátoru SpeedVac Savant. K vysušeným vzorkům bylo následně přidáno 200 μ l H₂O:MeOH (1:1), vzorky byly opět vysušeny a následně rozpuštěny ve 100 μ l 100mM Tris-Cl pufru pH 8,5.

U frakcí sacharosového **gradientu bez inhibitorů proteas** a **vzorků po štěpení CNBr** (viz předchozí odstavec) bylo nastaveno pH na hodnotu 8 – 9 (dle univerzálního indikátorového papírku) přidavkem 1,5M Tris-Cl pufru pH 8,8 (sacharosový gradient) či 1,6M Tris pH \approx 10,5 (vzorky štěpené CNBr). Ke všem vzorkům byl přidán 1 μ g (sacharosový gradient) či 2 μ g (vzorky štěpené CNBr) trypsinu Gold a vzorky byly ponechány inkubovat ve vodní lázni při 37 °C přes noc. Po vyjmutí z lázně byla enzymatická reakce zastavena okyselením směsi na hodnotu pH \leq 4 (dle indikátorového papírku) přidavkem 10% TFA (gradient) či 70% TFA (vzorky štěpené CNBr). Vzorky enzymaticky štěpené přímo v gradientu (bez inhibitorů proteas) spojeny dle schématu (Obr. 16), obdobně jako vzorky před štěpením CNBr. Vzorky byly dále připraveny pro MS analýzu odsolením a převedením do MS solventů (viz část 3.2.10 této práce).



Obr. 16: Separace DRM ultracentrifugací v sacharosovém gradientu. Vzorek byl na diskontinuální gradient nanesen ve 45% sacharosovém roztoku. Spojování jednotlivých frakcí rozebraného gradientu (1 – 8) pro proteomické analýzy je znázorněno barevnými úsečkami.

3.2.10. Příprava peptidových vzorků pro hmotnostní spektrometrii

Odsolení a zbavení vzorků detergentu bylo s úpravami provedeno dle Reye et al.^{/92/}

Okyselené vzorky po chemické a/nebo enzymatické proteolýze (viz část 3.2.9 této práce) byly odsoleny na kolonce s obrácenou fází „peptide MacroTrap“. Na kolonku ekvilibrovanou 500 μ l 0,1% FA byl pomalu mikrostříkačkou Hamilton nanesen veškerý vzorek. Kolonka byla poté mikrostříkačkou promyta 500 μ l 0,1% FA (pro odstranění sacharosy a pufru), 1 ml 0,1% FA v CHCl₃ (odstranění detergentu a lipidů), 12 – 15 ml 0,4% FA (za použití HPLC pumpy Prominence LC20-AD, s rychlostí průtoku $v = 3$ ml/min; pro odstranění zbytků detergentu a chloroformu). Peptidy byly z kolonky eluovány 150 μ l 45% ACN v 0,1% FA. Kolonka byla následně mezi jednotlivými vzorky umyta promytím 500 μ l 90% ACN v 0,1% FA, 500 μ l čistícího roztoku na MacroTrap, 500 μ l 90% ACN v 0,1% FA a 500 μ l 0,1% FA. Veškeré roztoky pro odsolování byly připraveny z hypergrade LC-MS solventů.

Z eluátu byl odebrán 1 μ l alikvot na analýzu technikou MALDI-TOF (viz část 3.2.11 této práce) pro ověření efektivity odsolení a odstranění detergentu. Zbývající odsolené peptidové vzorky byly vysušeny na koncentrátoru SpeedVac Savant a skladovány při -20 °C či -75 °C.

3.2.11. MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Alikvot 1 μ l z eluátu peptidového vzorku po odsolení na kolonce MacroTrap (viz část 3.2.10 této práce) byl nanesen na AnchorChip 800/384 desku pro MALDI. Po zaschnutí byl převrstven 1 μ l HCCA matrice (1:1:1 H₂O:ACN:nasycený roztok HCCA v MeOH). Na kalibrační pozici MALDI desky bylo nanесeno 0,75 μ l roztoku peptidové kalibrační směsi II pro MS v HCCA matrici.

Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF (UltraFlex III) pracující v pozitivním reflektorovém MS módu byl kalibrován pomocí peptidové kalibrační směsi II. Energie laseru byla experimentálně nastavena dle intenzit, odstupu signálu od šumu a rozlišení kalibračních píků angiotensinu II (m/z 1046,5418) a ACTH peptidu 18–39 (m/z 2465,1983). Data byla sbírána v rozsahu m/z 700 – 4000, přičemž ionty s m/z < 700 byly iontovou optikou deflektivně suprimovány. Výsledné hmotnostní spektrum bylo získáno akumulací spekter z jednotlivých laserových pulsů, které byly manuálně zaměřeny na různá místa pozice se vzorkem. Data byla vyhodnocena v programu flexAnalysis.

3.2.12. LC-MALDI-TOF/TOF hmotnostní spektrometrie

Vysušené peptidové vzorky, odsolené a zbavené detergentu (viz část 3.2.11 této práce), byly rozpuštěny ve 30 μ l 5% ACN v 0,2% FA, vortexovány a sonikovány po dobu 10 minut. Vzorky byly přeneseny do 250 μ l vialek se septem, ze kterých byly autosamplerem Famos v nástřikovém objemu 5 μ l zavedeny do HPLC systému Dionex UltiMate. Tento systém byl konfigurován pro mikroHPLC aplikace pomocí rozdělovače mobilní fáze, který při nastavené rychlosti průtoku mobilní fáze (master flow) $v_{in} = 200 \mu\text{l/min}$ dovozoval reálnou rychlost průtoku mobilní fáze skrz chromatografickou kolonu a na sběrač frakcí $v_{out} \approx 3 \mu\text{l/min}$. Nanesené vzorky byly separovány na 0,2 \times 150 mm kapilární chromatografické koloně s obrácenou fází Magic C18AQ s částicemi o průměru 5 μ a velikosti pórů 200 Å. Vzorky byly nanесeny na kolonu ekvilibrovanou v 99% solventu A (1% ACN v 0,1% TFA) a byly eluovány gradientově, postupným lineárním zvyšováním podílu solventu B (95% ACN v 0,08% TFA) dle schématu (Tab. 4, str.59). Oba solventy v čistotě hypergrade pro LC-MS byly

před použitím odplyněny sonikací pod vakuem a v průběhu chromatografie byly syceny plyným heliem.

Frakce eluátu byly pomocí robotického sběrače frakcí Proteineer fc přímo nanášeny na pozice MALDI desky AnchorChip 800/384. Současně byla se vzorkem diskontinuálně (v 3sekundových pulsech) deponována HCCA matrice pro LC-MALDI-MS v objemu 1,5 µl na pozici. Frakce byly sbírány po 15sekundových intervalech v čase 11 – 107 minut od nástřiku vzorku. Průběh chromatografie byl současně sledován pomocí UV detektoru (zařazeného před sběrač frakcí), který snímal absorbanci eluovaného vzorku při 218 a 280 nm. Po zaschnutí vzorku a krystalizaci matrice byl na kalibrační pozice MALDI desky nanesen v objemu 0,75 µl na pozici peptidový kalibrační roztok II pro MALDI v HCCA matrici pro LC-MALDI-MS ředěné vodou v poměru 4:1 (matrice : H₂O).

Vzorky nanesené na MALDI desce byly analyzovány pomocí MALDI-TOF hmotnostního spektrometru (UltraFlex III) pracujícího v pozitivním reflektorovém módu. Přístroj byl kalibrován pomocí peptidové kalibrační směsi II. Energie laseru byla nastavena obdobně jako v části 3.2.11 této práce, přičemž pro LIFT MS/MS mód byla energie laseru nastavena o 3 – 5 % vyšší než pro MS mód. Vhodnost zvolené energie laseru byla ověřena na několika manuálně naměřených MS spektrech z různých pozic desky. Data byla sbírána v rozsahu m/z 700 – 4000, s deflekční supresí iontů s $m/z < 700$. Vlastní průběh analýzy byl automaticky řízen z programu WARP-LC a pomocí AutoXecute metod programu flexControl. Nejdůležitější parametry použitých metod shrnuje tabulka (Tab. 5, str. 60), podrobnosti jsou uvedeny v příloze č. 1.

Automatická analýza probíhala následovně: nejprve byla změřena MS spektra všech 384 frakcí na AnchorChip 800/384 desce, přičemž pro každé 4 pozice bylo změřeno kalibrační spektrum peptidového kalibračního standardu II z příslušné kalibrační pozice. Pomocí těchto kalibračních spekter byla následně v programu flexAnalysis externě kalibrována veškerá změřená MS spektra. Píky, přítomné v MS spektrech z více než 70 %

Tab. 4: Profil gradientu pro separaci peptidů na koloně s obrácenou fází.

t [min]	solvent A	solvent B
	[%]	[%]
0	99	1
1	95	5
11*	-	-
94*	55	45
107	55	45
109	1	99
122	1	99
123	99	1
131	99	1
132	1	99
139	1	99
140	99	1
155	99	1

Pozn.: Eluát byl sbírán a deponován na MALDI desku v čase 11 – 94 min ().*

pozic na desce, byly označeny jako pozadí a pro další analýzu byly ignorovány. Píky s odstupem signálu od šumu $S/N > 5,00$ byly vybrány jako prekurzorové píky pro MS/MS analýzu a byla zjištěna jejich distribuce ve spektrech jednotlivých frakcí na desce. Algoritmus programu WARP-LC posléze vybral pro jednotlivé prekurzory pozici desky, ze které bylo danou kolizi nejvhodnější uskutečnit (na základě S/N poměru prekurzoru a omezení počtu kolizních spekter měřených z jedné pozice desky – viz tabulka Tab. 5). Poté byla z příslušných pozic v pozitivním módu změřena kolizní LIFT MS/MS spektra daných prekurzorových iontů. Okno pro výběr prekurzorového iontu bylo 5,0 Da, kolizní spektra byla sbírána v rozsahu m/z 40 až (m/z prekurzoru + 20 %). Získaná spektra (ve formátu seznamů píků) byla automaticky kombinována s informacemi o chromatografických elučních časech daných frakcí na MALDI desce. Takto získané datové soubory byly následně zpracovány metodami automatizované interpretace hmotnostních spekter (viz část 3.2.13 této práce).

Tab. 5: Nejdůležitější nastavení spektrometru UltraFlex III pro LC-MALDI-TOF/TOF analýzy.

Parametr	Hodnota
flexControl	
Mass measurement range:	700 - 4000
Ion suppression:	< 700
Calibration masslist:	PeptideCalibStandard mono
flexControl AutoXecute	
Calibration accumulation:	500 shots
Calibration movement:	random walk - 10 shots
MS accumulation:	700 shots
MS movement:	random walk - 20 shots
MS/MS accumulation parent:	500 shots
MS/MS accumulation fragment:	900 shots
MS/MS movement:	random walk - 30 shots
WARP-LC	
Workflow:	LC-MALDI
Retention time delay:	11 min
Time slice:	15 sec
Most intense precursor selection window:	5,0 Da
S/N threshold for MS/MS precursor:	5,00
Max. MS/MS measurements / fraction:	20 + more if no other choice
Acquisition Order:	Target Position
MS tolerance:	100 ppm
Merge compounds separated by less than:	6 fractions
ID as background if in more than:	70 % fractions

3.2.13. Automatizovaná interpretace kolizních hmotnostních spekter

Datové soubory hmotnostních spekter získané z jednotlivých analýz (viz část 3.2.12 této práce) byly automaticky interpretovány a využity pro identifikaci proteinů ve vzorku. Identifikace probíhala pomocí programu Mascot s databází proteinových aminokyselinových sekvencí SwissProt, který byl lokálně provozován na laboratorním serveru. Komunikace se serverem a zpracování výsledků interpretace spekter a identifikace proteinů probíhala přes program BioTools. V případech, kdy byla pro jeden vzorek k dispozici naměřená data z několika opakovaných LC-MALDI-MS analýz či byl analyzován stejný vzorek (stejný druh buněk, stejné podmínky izolace a digesce membrán, stejné parametry MS analýzy) z jiné kultivace buněk, byla data pro vyhledávací algoritmus kombinována v programu WARP-LC. Interpretace spekter a bottom-up identifikace proteinů (viz části 1.4.4 a následující této práce) byla provedena s parametry shrnutými v tabulce (Tab. 6). Výsledky identifikací proteinů byly zobrazeny a zpracovány v programech SurveyViewer, ProteinBrowser, DataAnalysis a BioTools.

Tab. 6: Nastavení identifikačního algoritmu Mascot.

Parametr	Trypsin	CNBr/Trypsin
Method type:	MS/MS	
Database:	SwissProt 2012	
Taxonomy:	Human (homo sapiens)	
Enzyme:	Trypsin/P	CNBr+Trypsin
Global modifications:	none	
Variable modifications:	Acetyl (Prot. N-term.)	Acetyl (Prot. N-term.)
	Oxidation (M)	Oxidation (M)
	Oxidation (HW)	Oxidation (HW)
		Met->Hsl (C-term. M)
		Met->Hse (C-term. M)
Error tolerant:	NO	
Quantitation:	none	
Partials (missed cleavage):	≤ 2	
Mass tolerance MS:	100 ppm	
Mass tolerance MS/MS:	± 0,5 Da	
Masses / charge state:	1+, monoisotopic	
Instrument:	MALDI-TOF/TOF	
Fuzzy Logic scoring file:	MSMS_LowStringency.MSMSfis	
Scoring:	MudPIT	
Require bold red:	YES	
Decoy search:	YES	
Ion score cut-off:	20	
Significance threshold:	p < 0,01	

Pozn.: Sloupce Trypsin a CNBr/Trypsin označují po řadě nastavení pro vzorky připravené štěpením proteinů trypsinem přímo v sacharosovém gradientu, respektive srážením a purifikací proteinů následovaným jejich štěpením CNBr a trypsinem.

4. VÝSLEDKY

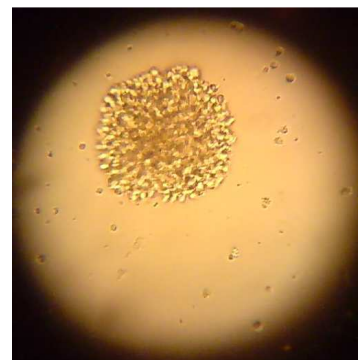
4.1. Kultivace NK buněk

Pro analýzu proteomu membránových mikrodomén lidských NK buněk, která byla cílem této práce, bylo nejprve nutno získat značná množství NK buněk. Pro každou podmínku izolace DRM (detergentu rezistentní membránové frakce) metodou isopyknické gradientové ultracentrifugace bylo zapotřebí cca $1 - 1,5 \times 10^8$ buněk. Buněčná populace použitá pro analýzu zároveň musela být značně čistá, aby nedocházelo k ovlivnění výsledků identifikovaných proteinů proteiny pocházejícími z jiných typů buněk. Jelikož aktivací a signalizační stav buněk může mít vliv na uspořádání mikrodomén v rámci buněčné membrány (viz část 1.3.4 této práce), byly buňky linie NK-92MI i NK buňky získané od neleukemických dárců stimulovány IL-2 v kultivačním médiu.

4.1.1. Kultivace linie NK-92MI

Jako jedna z možných cest získání velkého počtu čistých lidských NK buněk byla využita kultivace zavedené laboratorní linie NK-92MI. Buňky této linie se vyznačují NK buněčným fenotypem, ale jsou lymfoblastomového původu^{/21/}, tudíž bez problémů expandují *in vitro* ve tkáňových kulturách a počet jejich buněčných dělení není limitován zkracováním telomer. V důsledku toho jsou tyto buňky, stejně jako ostatní laboratorní buněčné linie, ve své podstatě nesmrtelné.

Buňky byly pěstovány v kultivačním médiu odvezeném od standardního média α MEM s relativně vysokým ($2 \times 12,5\%$) obsahem koňského (HS) a fetálního telecího séra (FBS) – viz část 3.2.1 této práce. Ačkoli je linie NK-92MI stabilně transdukována genem pro syntézu lidského IL-2, který slouží coby faktor podporující proliferaci NK buněk, a buňky jsou takto schopny autokrinní či parakrinní stimulace, další přídavek tohoto cytokinu do kultivačního média se ukázal jako přínosný pro lepší proliferaci. Buňky linie byly pěstovány suspenzně ve tkáňových kultivačních lahvích, kde viabilní buňky tvořily kompaktní buněčné shluky. Na snímku z optického mikroskopu (Obr. 17) je patrný takovýto shluk i určitý počet mrtvých buněk, které se v suspenzi vyskytovaly volně. Buněčné shluky byly šetrně rozrušovány při subkultivaci (pasážování) buněk opatrným pipetováním kultivační suspenze po stěně lahve,



Obr. 17: Kultivace buněk linie NK-92MI. Na snímku z optického mikroskopu je patrný shluk viabilních NK buněk a několik jednotlivých mrtvých buněk.

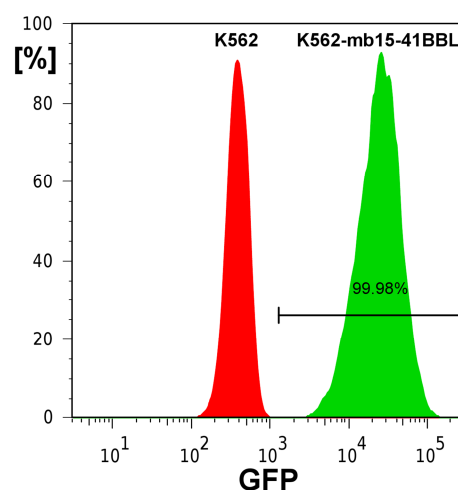
aby nedocházelo k lokálnímu odumírání buněk z důvodu nepřístupu živin z média a vysoké lokální buněčné density. Z důvodu lokálních densit buněčné kultury bylo též pro úspěšnou kultivaci buněk zásadní zajištění rovnoměrného rozprostření kultivovaných buněk po dně kultivační lahve. Požadovaného počtu cca 6×10^8 buněk (pro 4 paralelní podmínky izolace DRM) bylo dosaženo po 2 – 3 týdnech kultivace (tj. po 5 – 7 pasážích), dle konkrétního subkultivačního schématu a počáteční viability buněk po rozmražení. Buněčná linie nebyla kultivována dlouhodobě, ale pro každou izolaci byla obnovena ze zásobních alikvotů uchovávaných při $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.2. Expansní protokoly pro NK buňky z lidské periferní krve

Kromě proteomické analýzy membránových mikrodomén lidských NK buněk linie NK-92MI bylo též cílem této práce provedení obdobné analýzy u lidských NK buněk získaných z periferní krve neleukemických dárců.

První zkoušenou cestou pro získání dostatečných množství čistých NK buněk potřebných pro proteomické analýzy byla jejich expanse ze směsi mononukleárních buněk z periferní krve (PBMC). Pro tuto expansi byl testován expansní protokol (autory nazvaný NKAES) publikovaný Dr. Imai a Dr. Campanou^{/20,34/}, který spočíval v kokultivaci PBMC či malých množství separovaných $\text{CD}56^{+}$ / $\text{CD}3^{-}$ NK buněk s geneticky modifikovanými nádorovými buňkami linie K562-mb15-41BBL (viz části 3.2.2 a 3.2.3 této práce). Lidské nádorové buňky K562 představují cílové buňky rozpoznávané lidskými NK buňkami a zmíněná genetická modifikace vedla u těchto buněk k povrchové expresi molekul IL-15 a ligandu 41BB způsobujících aktivaci a stimulaci proliferace NK buněk.^{/34/}

Prvotní pokusy s tímto expansním systémem nevedly k významnému zvýšení počtu buněk v kultuře, proto byla u stimulačních nádorových buněk linie K562-mb15-41BBL, získaných přímo od Dr. Campany, ověřena míra exprese GFP. Tento fluorescenční protein byl skupinou Dr. Campany kotransdukován do buněk linie K562 společně s geny pro stimulační molekuly, aby působil coby reporterový protein při selekci úspěšně transdukovanych buněk pro klonální amplifikaci. Na záznamu z průtokové cytometrie (Obr. 18) je

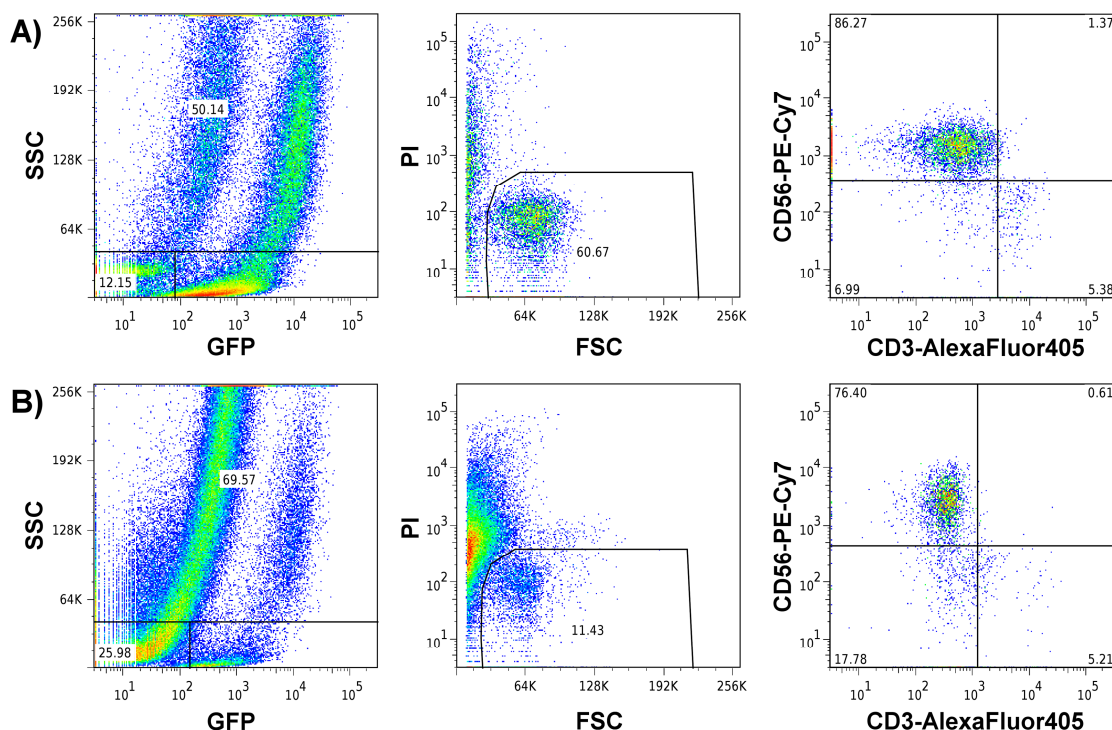


Obr. 18: Cytometrické srovnání GFP-pozitivity buněk transdukované a netransdukované linie K562. Zobrazen je překryv spekter pro jednotlivé linie. Úsečkou je vyznačeno procento GFP^{+} buněk v transdukované linii.

srovnání míry fluorescence GFP mezi obyčejnými a transdukovanými buňkami linie K562. Obě buněčné populace jsou zřetelně oddělené a v transdukované buněčné populaci (zelená křivka) je prakticky 100 % buněk GFP pozitivních, což naznačuje, že transdukce je opravdu stabilní a nedošlo ke ztrátě exprese transdukovaných proteinů.

Po ověření GFP positivity použité stimulační nádorové linie byly zopakovány pokusy o expansi NK buněk s linií K562-mb15-41BBL a následně, ve spolupráci s imunologickou skupinou Dr. Fišerové z Laboratoře přirozené buněčné imunity MBÚ AV ČR, v.v.i., byly rozsáhle testovány (viz část 3.2.3 této práce) možnosti expance i za použití odlišných kultivačních médií, použití plné lidské heparinizované krve namísto krve získané z transfuzní stanice ve formě „buffy coatu“ či za využití buněčné linie RPMI-8866^{/31/} pro stimulaci proliferace NK buněk. Žádný ze zkoušených expansních protokolů nevedl k požadovaným mírám proliferace, jelikož buňky kultury vždy po prvních cca pěti dnech kultivace odumřely.

Chování expansních kultur pro ilustraci demonstruje záznam z průtokové cytometrie (viz část 3.2.5 této práce) systému NKAES s CD56⁺ / CD3⁻ selektovanými NK buňkami (Obr. 19). V panelu A je NKAES kultura při začátku kultivace. V levém grafu jsou v horním kvadrantu patrné velké/granulární (dle míry bočního rozptylu světla SSC^{/93/})



Obr. 19: Chování NKAES buněčné kultury dle průtokové cytometrie. A – kultura na počátku kultivace, B – kultura po týdenní kultivaci. SSC – boční rozptyl světla (granularita a velikost částic), FSC – přímý rozptyl světla (velikost částic), PI – propidium jodid (viabilita buněk). Grafy v prostředních panelech jsou znázorněny pro populaci lymfocytů v levých dolních kvadrantech grafů v levých panelech. Grafy v pravých panelech jsou zobrazeny pro vyznačené kvadranty grafů ve středních panelech.

nádorové buňky stimulační linie, u jejichž převážné části byla i po určité době uplynulé od ozáření buněk RTG zářením stále značná míra exprese GFP. V pravém dolním kvadrantu jsou patrné malé/méně granulární GFP⁺ buňky nádorové linie. V levém dolním kvadrantu je subpopulace malých lymfocytů, jejichž viabilita se dle intensity signálů propidium jodidu v prostředním grafu pohybovala okolo 61 %. Značná část PI⁺ signálů v prostředním grafu je způsobena přítomností malých objektů (dle přímého rozptylu světla FSC), kterými byly pravděpodobně v převážné míře zbytky rozpadlých nádorových buněk. Čistota viabilních NK lymfocytů je patrná z pravého grafu a činila asi 86 %. Situaci v kultuře po týdenní kultivaci demonstruje panel B – z levého grafu je patrné, že většina nádorových buněk ztratila expresi GFP – odumřela. Toto je potvrzeno v prostředním grafu, kde vzrostlo procento velmi malých PI⁺ signálů, což také svědčí o rozpadu nádorových buněk. Dále ovšem vzrostla i míra zastoupení větších PI⁺ buněk, což může být i výsledkem apoptotizace lymfocytů. Míra čistoty NK buněk se zásadně nezměnila (mírně klesla na 76 %). Největším problémem ovšem zůstal fakt, že počet viabilních NK buněk se dle průtokové cytometrie v kombinaci s manuálním počítáním buněk v kultuře nijak zásadně nezvýšil.

4.1.3. Izolace NK buněk z lidské periferní krve

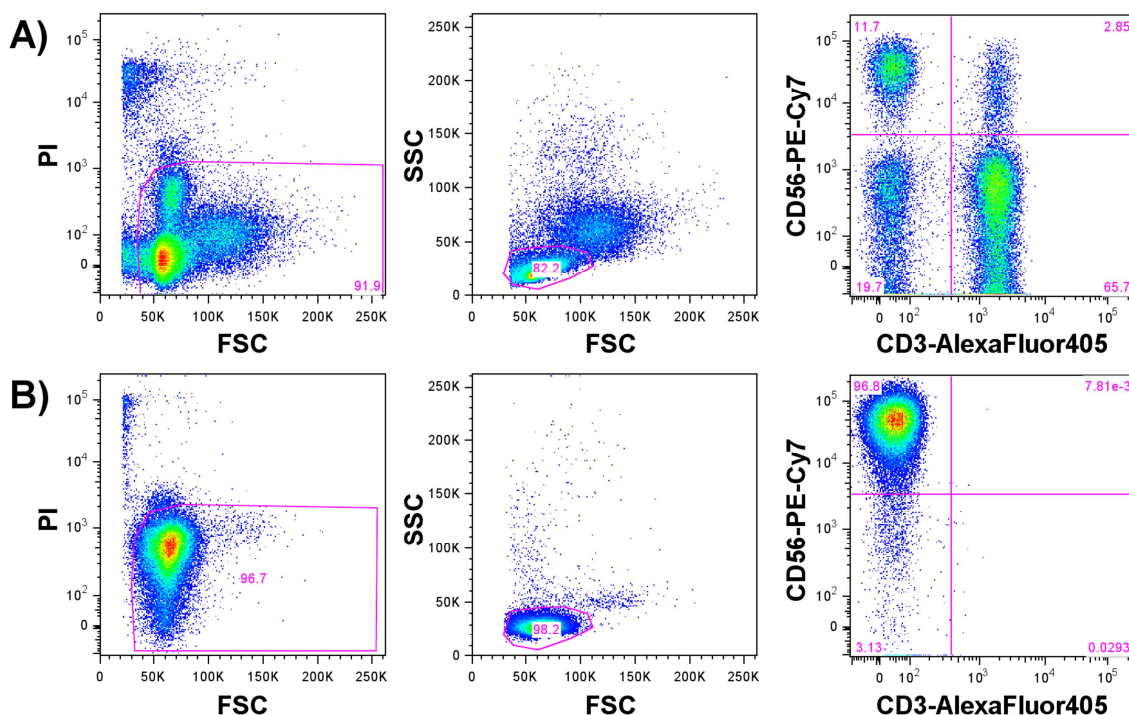
Alternativním postupem k expansi NK buněk kokultivací se ukázala být cesta jejich přímé separace z periferní krve lidských dárců (viz část 3.2.4 této práce) bez dlouhodobé kultivace.

Z krve jednoho dárce, získané při standardním odběru, bylo ovšem možné získat pouze omezená množství NK buněk (teoreticky cca $4 - 7 \times 10^7$ buněk pro standardní krevní derivát „buffy coat“, získaný z odběru 450 ml plné krve dárce s 10 % NK buněk mezi krevními lymfocyty). Prakticky dostupné výtěžky NK buněk byly navíc obvykle dále sníženy ztrátami při izolaci buněk a manipulaci s materiálem a činily v závislosti na dárci cca $2 - 5 \times 10^7$ buněk. Pro získání čistých NK buněk v množstvích potřebných pro proteomickou analýzu bylo tedy nutné separovat NK buňky od více dárců, pro vyloučení jakékoli křížové reaktivity buněk z nich odděleně izolovat DRM a frakce rozebraného gradientu uchovat při -75°C do doby, než budou získány membrány z dostatečného počtu buněk. Jelikož jsou PBMC lymfocyty oproti nádorovým buňkám linie NK-92MI dle optické mikroskopie menší, bylo rozhodnuto použít pro proteomickou analýzu membrány z minimálně 2×10^8 buněk a pro rozbíjení buněk po hypotonickém osmotickém šoku více využít nejtenčí běžně dostupnou jehlu s tloušťkou 29G (vnitřní

průměr $0,165 \pm 0,038 \text{ mm}$)^{94/}, oproti jehle s tloušťkou 25G (vnitřní průměr $0,241 \pm 0,038 \text{ mm}$)^{94/}, používané pro buňky linie NK-92MI.

Vlastní izolace NK buněk byla provedena z PBMC buněk (izolovaných z krve – viz část 3.2.2 této práce), stimulovaných přes noc IL-2 v kultivačním médiu. Pro izolaci byl využit automatizovaný buněčný separátor RoboSep, na kterém byly NK buňky separovány negativní imunomagnetickou selekcí s využitím kitu EasySep (viz část 3.2.4 této práce).

Průběh separace (Obr. 20) byl monitorován za pomoci průtokové cytometrie (viz část



Obr. 20: Průběh imunomagnetické separace NK buněk z PBMC dle průtokové cytometrie. A – PBMC před separací, B – buňky po imunomagnetické separaci negativní selekcí. PI – propidium jodid (viabilita buněk), FSC / SSC – přímý / boční rozptyl světla (velikost buněk a granularita). Grafy v pravém panelu jsou znázorněny pro vyznačené kvadranty grafů ve středním panelu. Ty jsou obdobně znázorněny pro kvadranty v grafech levého panelu.

3.2.5 této práce). Panel A představuje z krve izolované PBMC, kultivované přes noc za stimulace IL-2 v RPMI-1640 médiu. V levém grafu je patrná cca 92% viabilita buněk po izolaci z krve a kultivaci. V prostředním grafu je patrná distribuce buněk různých velikostí v kultuře – označen je lymfocytární kvadrant, subpopulace monocytů je dobře patrná okolo hodnot SSC > 50k a FSC > 75k a subpopulace granulocytů (v plné krvi dobře patrná okolo FSC ~ 100k a s vysokým stupněm granularity SSC > 100k) byla z větší části odstraněna při separaci PBMC. Pravý graf konečně ukazuje zastoupení NK, NKT a T lymfocytů daného dárce. NK buněk (CD56⁺ / CD3⁻) je mezi lymfocyty tohoto dárce přítomno asi 12 %, T buněk (CD56⁻ / CD3⁺, výrazně stimulovaných kultivací s IL-2) asi 66 % a konečně NKT buněk (CD56⁺ / CD3⁺) asi 3 %. Situaci po imunomagnetické

separaci NK buněk dokládá panel B, kde je patrná jasná deplece naprosté většiny monocytů, granulocytů, T i NKT lymfocytů.

Čistota získané NK buněčné populace mezi 96 až 98 %, stejně jako vysoká viabilita pohybující se okolo 94 až 98 % byla standardně dosahována u všech separací. Z hlediska kvantity získaných NK buněk velmi záviselo na jednotlivých dárcích, kdy pro optimální výtěžky (pohybující se dle dárce mezi cca 50 až 75 % teoreticky získatelných NK buněk) byla nezbytná důkladná resuspendace a filtrace buněčné suspenze pro odstranění shluků buněk. Taktéž bylo vhodné, aby dárce před izolací měl mezi lymfocyty alespoň 10 % NK buněk. Se ztrátami způsobenými manipulací se vzorky buněčných suspenzí a přirozenou apoptotizací některých buněk bylo pro získání požadovaných 2×10^8 buněk pro jedny podmínky izolace DRM nutno postupně izolovat NK buňky od šesti až sedmi dárců.

4.2. Klasická proteomická analýza DRM

Získané NK buňky, ať již liniového původu či od neleukemických dárců byly podrobeny hypotonickému osmotickému šoku a následně rozbity protahováním skrz injekční jehlu. Prefrakcionací buněčné suspenze byla izolována membránová frakce, která byla následně za chladu podrobena solubilizaci 1% neionogenním detergentem Brij-98 nebo Triton X-100. Membránový lyzát byl ve 45% roztoku sacharosy převrstven 0 – 30% diskontinuálním sacharosovým gradientem a DRM byly preparovány 18 hodinovou ultracentrifugací (viz část 3.2.6 této práce). Gradient, ve kterém byl u buněk linie NK-92MI v horní části s nižší hustotou sacharosy patrný bíle opalescentní proužek flotujících DRM, byl po frakcích rozebrán a proteinový profil jednotlivých frakcí byl analyzován pomocí polyakrylamidové gelové elektroforesy.

4.2.1. Polyakrylamidová gelová elektroforesa

Obecná informace o profilu obsahu proteinů v jednotlivých frakcích gradientu byla získána pomocí polyakrylamidové gelové elektroforesy v neredukujícím denaturujícím prostředí SDS. Proteiny v gelu byly následně vizualizovány barvením barvivem CBB-R250, které ovšem nebylo dostatečně citlivé pro vizualizaci proteinového složení gradientových frakcí s menší hustotou, ve kterých byla očekávaná přítomnost flotujících DRM. Proto bylo přistoupeno k alternativní vizualizaci proteinů v gelu pomocí barvení stříbrem (viz část 3.2.7 této práce).

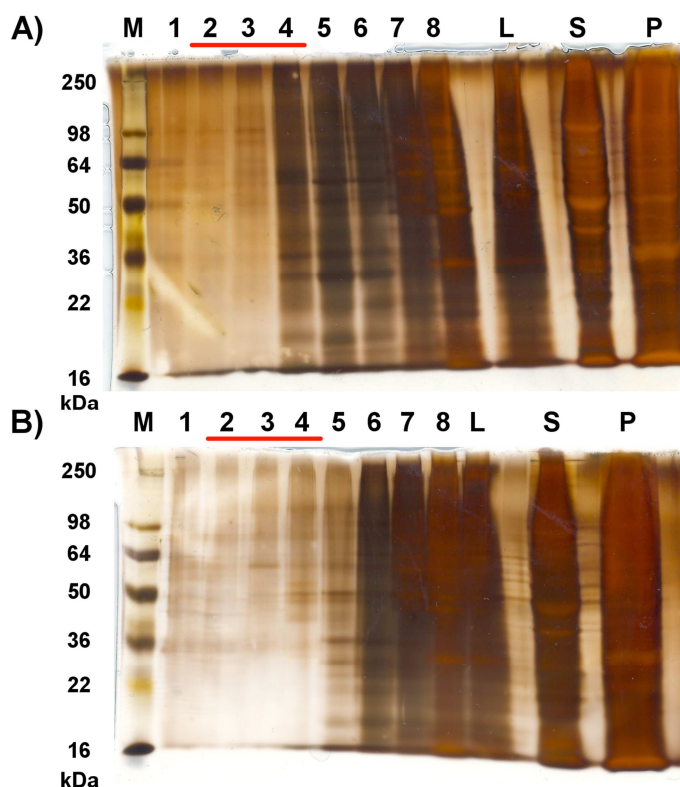
Na stříbrem barvených polyakrylamidových gelech (Obr. 21) je patrné srovnání proteinového složení frakcí sacharosového gradientu, ve kterém byly metodou isopyknické flotace děleny solubilizované lyzáty buněk linie NK-92MI. Panel A představuje gradient po solubilizaci membrán detergentem Brij-98, zatímco u panelu B byl využit Triton X-100.

Obsah proteinů u obou detergentů dle očekávání stoupá se vzrůstající hustotou gradientu, ale je zjevné, že i v méně hustých vrchních frakcích gradientu 2 – 4 jsou přítomny

proteiny. Tyto se ovšem mezi jednotlivými frakcemi a detergenty liší. Více proteinů v lehčích frakcích je při srovnání podmínek izolace přítomno v detergentu Brij-98, kdy je na proteiny bohatá zejména čtvrtá frakce gradientu. Oproti tomu u Tritonu X-100 je většina proteinů přítomna pouze ve spodních částech sacharosového gradientu (6, 7, 8). Také je vidět, že zdaleka nejvíce proteinů je dle očekávání detekováno v buněčné peletě, ale zároveň i velké množství proteinů zůstalo po prefrakcionaci v cytosolární supernatantové frakci. Frakce gradientu 2+3+4 byly dále využity pro proteomické charakterizace DRM hmotnostní spektrometrií.

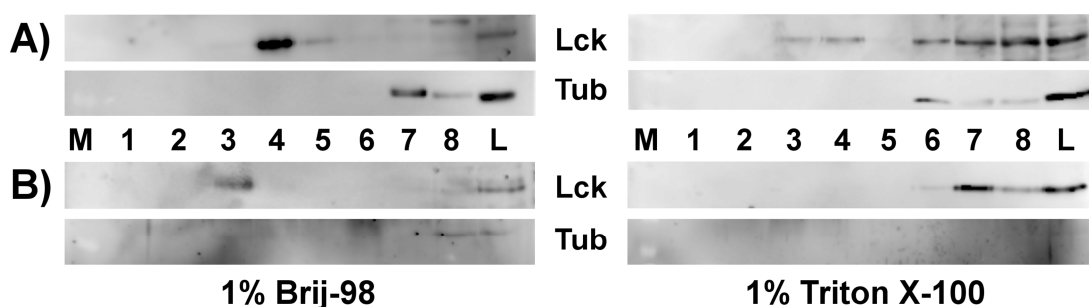
4.2.2. Elektropřenos a imunodetekce proteinů

Detailní profil výskytu proteinu ve frakcích gradientu byl sledován pro dva modelové proteiny pomocí elektropřenosu proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu a následné detekce proteinů pomocí specifických protilátek. Toto rozdělení proteinů mezi jednotlivé frakce gradientu též sloužilo pro potvrzení účinnosti izolace membránových raftů, respektive DRM.



Obr. 21: Proteinové složení frakcí sacharosového gradientu. SDS-PAGE gely barvené stříbrem. Solubilizační detergent: A – 1% Brij-98, B – 1% Triton X-100. M – standard proteinových hmotností, 1 – 8 frakce sacharosového gradientu, L – lyzát membrán nanášený na gradient, S – supernatant a P – buněčná peleta po prefrakcionaci. Vyznačeny jsou frakce použité pro proteomickou analýzu DRM.

Jako negativní kontrola byl využit protein α -tubulin, který je podjednotkou cytoskeletárního tubulinového filamenta a není známa žádná jeho interakce s membránovými rafty. Jako modelový protein, o kterém je známo, že se vyskytuje v membránových raftech, byla zvolena Lck kinasa – protein tyrosin kinasa, patřící do rodiny kinas Src. Proteiny byly na membráně detekovány pomocí specifických primárních protilátek vůči svým epitopům. Navázané primární protilátky byly následně rozpoznány sekundární protilátkou konjugovanou s enzymem křenovou peroxidasou. Místa na membráně s přítomností peroxidasy byla vizualizována za pomoci chemiluminiscence luminolu v důsledku štěpení H_2O_2 , přítomného v inkubačním roztoku, aktivitou peroxidasy.



Obr. 22: Imunodetekce proteinů v sacharosovém gradientu po jejich elektropřenosu na membránu. A – buňky linie NK-92MI, B – NK buňky separované z krve neleukemických dárců. M – standard molekulových hmotností, L – membránový lyzát nanášený na gradient. Lck – protein tyrosin kinasa Lck, Tub – α -tubulin.

Na snímcích z kamerového systému LAS-3000 (Obr. 22) je v panelu A distribuce zkoumaných proteinů mezi frakcemi gradientu u buněk linie NK-92MI. Tubulin je dle předpokladů přítomen u obou použitých detergentů ve spodních frakcích gradientu. U Tritonu X-100 se tubulin vyskytuje mezi frakcemi 6 – 8, zatímco u Brije-98 je tento protein pouze ve frakcích 7 a 8. Při všech elektropřenosech byl do poslední dráhy gelu nanesen jako pozitivní kontrola příslušný membránový lyzát, nanášený na separační gradient. Situace týkající se kinasy Lck je zajímavější. V detergentu Brij-98 naprostá většina této kinasy flotuje ve frakci 4, s malým množstvím přítomným též ve frakci 5. Naproti tomu při využití detergentu Triton X-100 pro solubilizaci membrány nacházíme Lck v horních frakcích 3 a 4, ale také ve větším množství ve spodních frakcích gradientu 6 – 8. V panelu B jsou znázorněny výsledky stejného pokusu provedeného s NK buňkami separovanými z krve neleukemických lidských dárců, u kterých byly smíchány alikvoty rozebraných frakcí gradientu od jednotlivých dárců. Kinasa Lck je u detergentu Brij patrná opět pouze v horní frakci 3, zatímco u Tritonu je již tato kinasa pouze v hustších frakcích (6), 7 a 8. Tubulin nejprve nebyl detekován ve vzorcích separovaných NK buněk vůbec, nicméně po otestování několika různých protilátek a podmínek elektroforesy byl za cenu

přeexponování snímku s použitím WestFemto kitu tubulin detekován ve frakci 8 detergentu Brij. U detergentu Triton se nicméně přítomnost tubulinu prokázat nepovedlo. Z elektropřenosu proteinů separovaných NK buněk a intenzity signálů poskytnutých jejich imunodetekcí specifickými protilátkami, které byly prováděny za totožných podmínek jako u buněk linie, bylo patrné, že množství proteinu získaného izolací membrán separovaných buněk bylo podstatně menší než u liniových buněk.

4.3. Hmotnostně spektrometrická proteomická analýza DRM

Po ověření funkčnosti metody separace DRM pomocí v předchozí kapitole zmíněných klasických proteomických přístupů, založených na analýze proteinového složení vzorku pomocí gelové elektroforesy a imunodetekce proteinů, byly pro analýzu vzorků DRM využity proteomické přístupy hmotnostní spektrometrie. Frakce gradientu 1, 2 – 4, 5 – 6 a 7 – 8 byly spojeny, proteiny přítomné v jednotlivých frakcích byly proteolyticky štěpeny na peptidy a vzorky byly následně zbaveny detergentů a lipidů. Pro proteolýzu byla použita proteasa trypsin samostatně či v kombinaci s předchozím chemickým štěpením vzorku CNBr. Směs peptidů byla analyzována metodami hmotnostní spektrometrie a na základě identifikací jednotlivých peptidů byla provedena tzv. „bottom-up“ identifikace proteinů přítomných původně ve vzorku (viz část 1.4.3 a následující této práce).

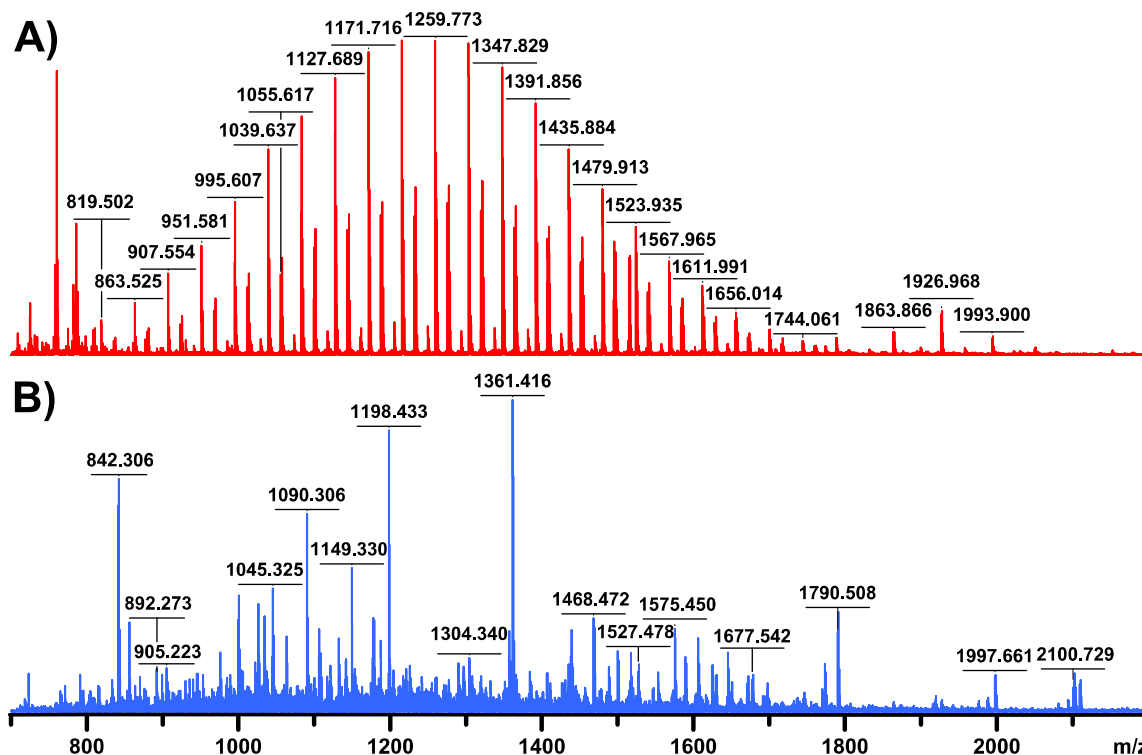
4.3.1. Odstranění detergentu, sacharosy a solí ze vzorků

Po enzymatické (a případně chemické) digesci proteinů ve vzorcích, vzniklých spojením frakcí gradientu (viz část 3.2.9 této práce), bylo nutné z těchto vzorků izolovat peptidy a odstranit komponenty pufrů (jako různé soli, sacharosu, lipidy či zejména detergenty), které mohou interferovat s hmotnostně spektrometrickou analýzou. Tyto látky totiž mohou mít zásadní vliv na kapalinově chromatografickou separaci peptidů na obrácené fázi, krystalizaci MALDI matrice či na proces ionizace molekul analytu ve hmotnostním spektrometru.

Odstranění nežádoucích složek vzorku a nabohacení peptidů bylo provedeno současně na mikrokolonce MacroTrap. Tato kolonka obsahuje polymerní nosič, který je svými retenčními vlastnostmi podobný C8 nosiči na kolonách s obrácenou fází. Na kolonce byly zachyceny peptidy ze vzorku, zatímco soli a sacharosa byly odmyty okyselenou vodou. Lipidy společně s detergenty byly odstraněny promytím chloroformem (viz část 3.2.10 této práce). Peptidy byly z kolonky uvolněny elucí 45% ACN a po jejich nanesení na MALDI

desku společně s HCCA matricí byl technikou MALDI-TOF analyzován peptidový profil jednotlivých spojených frakcí. Taktéž byla ověřena efektivita odstranění detergentu.

Význam odstranění detergentů ze vzorku před MALDI-MS analýzou je demonstrován na příkladu naměřených MALDI-TOF MS spekter (Obr. 23). V panelu A je hmotnostní

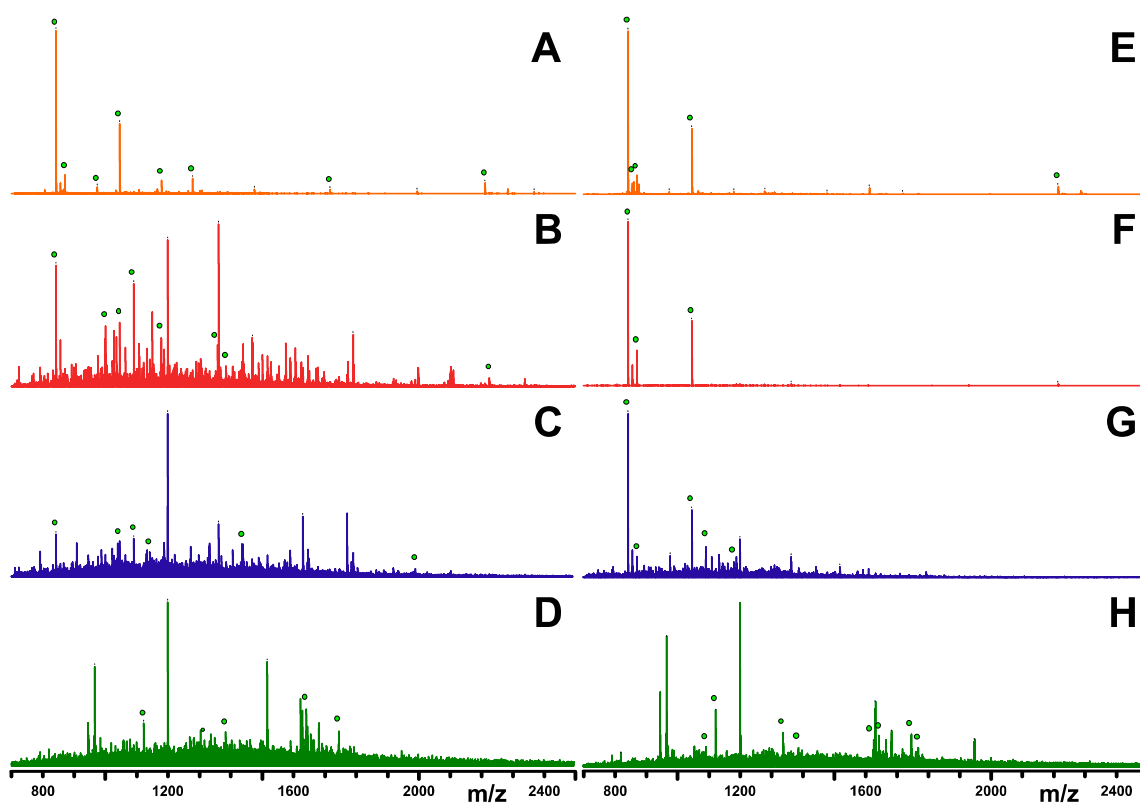


Obr. 23: Odstranění detergentu ze vzorku před MS analýzou. MALDI-TOF spektra peptidového vzorku s obsahem detergentu Brij-98 (A), vzorku po kompletním odstranění detergentu (B).

spektrum vzorku DRM (připraveného pomocí 1% Brije-98), ze kterého nebyl odstraněn detergent. Signály detergentu (série píků s pravidelnými diferencemi ~ 44 Da mezi jednotlivými píky) zcela dominují spektru a potlačují signály peptidů, jaké mohou být vidět ve spektru vzorku zcela zbaveného detergentu (Obr. 23, panel B). Pravidelné difference mezi píky odpovídají různému počtu monomerních jednotek v jednotlivých molekulách polymerního detergentu. Zmíněná hmotnostní difference 44 Da (přesněji 44,02622 Da) odpovídá monomerní jednotce polyoxyethylenu (polyethylenglykolu)^{95/}, který je strukturním základem obou použitých neionogenních detergentů – Brije-98 i Tritonu X-100 (viz Obr. 7 na straně 28). Vysoká intenzita signálů molekul detergentu je dána jejich velmi snadnou ionizací v porovnání s molekulami peptidů, což ve výsledku může vést k takřka úplné supresi signálů peptidů, ačkoli jsou ve vzorku přítomny.

4.3.2. MALDI-TOF analýza peptidového složení štěpených frakcí gradientu

Peptidové složení jednotlivých spojených frakcí (I – IV) sacharosového gradientu v závislosti na detergentu, použitém pro solubilizaci membrán, je ukázáno na obrázku 24.



Obr. 24: MALDI-TOF peptidový profil vzorků po štěpení proteinů ze sacharosového gradientu u buněk linie NK-92MI. Spojené frakce I – IV sacharosového gradientu po solubilizaci membrán 1% Brijem-98 (A – D) a 1% Tritonem X-100 (E – H). Všechny vzorky byly odsoleny a zbaveny detergentu. Několik nejvýraznějších píků v každém spektru způsobených běžnými kontaminanty (trypsin, keratin, HCCA klastry) je označeno kolečkem.

Totožný počet buněk linie NK-92MI byl za stejných podmínek podroben hypotonickému šoku, prefrakcionaci, gradientové ultracentrifugaci a digesci pomocí CNBr a trypsinu. Podmínky izolace DRM se lišily pouze detergentem, použitým pro solubilizaci membrán a přítomným v sacharosovém gradientu. Hmotnostní MALDI-TOF spektra peptidových směsí, získaných z jednotlivých frakcí gradientu, jsou pro 1% Brij-98 ukázány v pořadí frakcí I až IV v panelech A – D a pro 1% Triton X-100 v panelech E – H. Signály několika (6 – 8) nejvýraznějších píků známých kontaminant (jakými jsou klastry HCCA matrice nebo peptidy pocházející z autoproteolýzy trypsinu či z proteolýzy keratinu, přítomného v prachu a lidské pokožce) jsou pro ilustraci ve spektru označeny zeleným kolečkem.

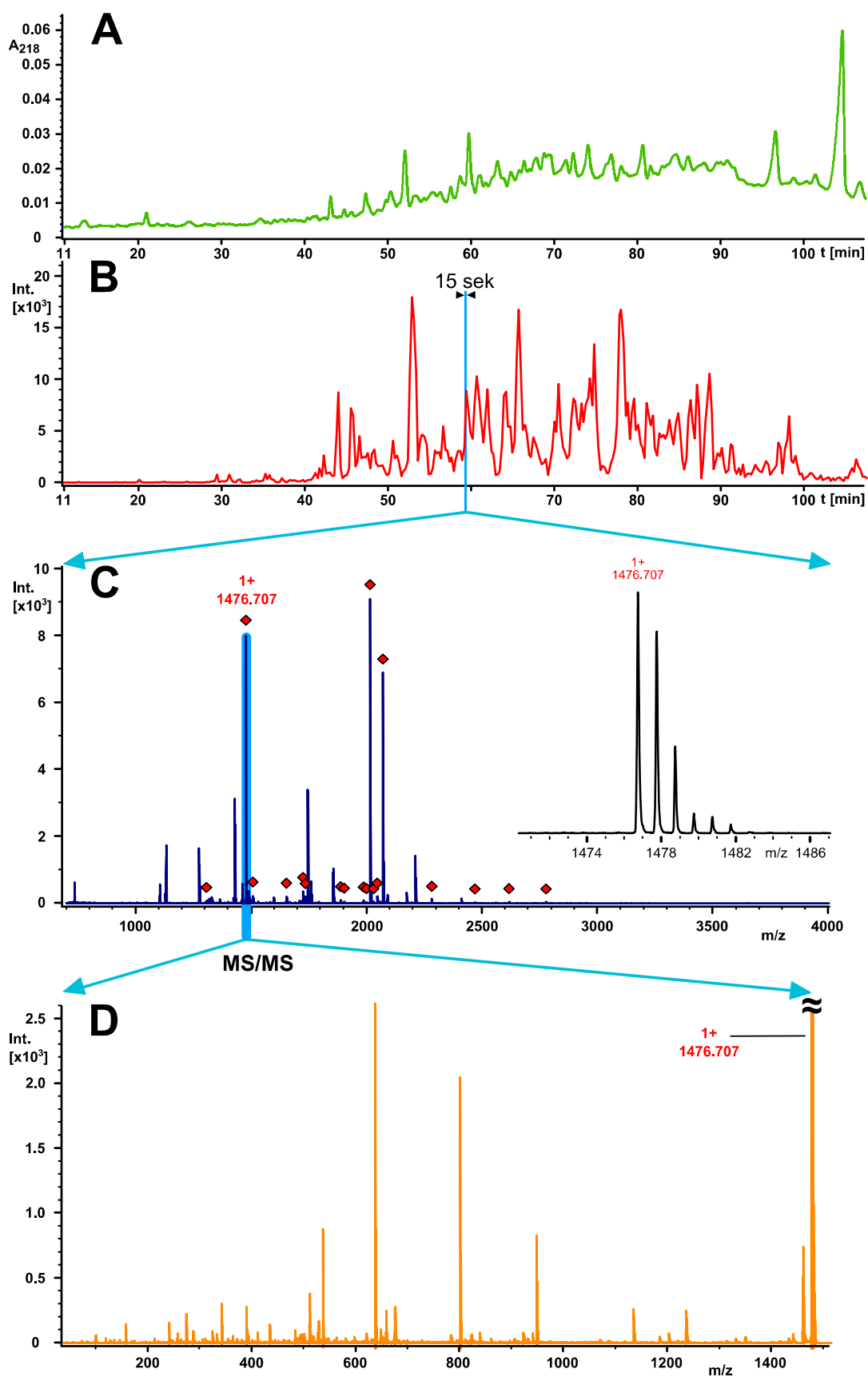
Je patrné, že peptidová směs gradientové frakce II, ve které flotují DRM, je při solubilizaci detergentem Brij-98 (panel B) podstatně bohatší než za použití detergentu Triton X-100 (panel F). Ve spektru F nejsou dokonce na první pohled zjevné žádné výrazné píky nepocházející od kontaminant. To ovšem neznamená, že tento vzorek žádné

takové peptidy neobsahuje – jsou pouze přítomné v mnohem menší míře oproti kontaminujícím látkám a ve výsledném spektru nejsou patrné. Spektra spodních frakcí gradientu (panely C, G a zejména D, H) jsou naproti tomu poznamenána omezenou rozlišovací schopností spektrometru, která ovšem taktéž vede ke spektru „vizuálně chudšímu“ na výrazné intenzivní píky. Tato spektra jsou velmi bohatá na různé píky (jejichž počet se pohybuje v řádech tisíců), které jsou ovšem relativně málo intenzivní a spektrometr je již není schopen odlišit od šumu a sebe navzájem. To vede ve výsledném spektru ke zvednutí základní čáry spektra od nuly (dobře patrnému v panelech C, D a H v oblasti m/z cca 800 – 2000). U hmotnostních spekter v jednotlivých panelech není zobrazena intenzita signálů na ose y z důvodu inherentní nevhodnosti MALDI-MS (bez speciálních kvantifikačních experimentálních uspořádání) pro kvantifikaci a srovnání úrovní signálů z různých měřených pozic desky či z různých vzorků. Absolutní hodnoty intensity jednotlivých píků (reálně měřené spektrometrem) jsou totiž primárně podmíněny intenzitou laseru použitého pro ionizaci a desorpci, (ne)homogenitou matrice a jejího promísení se vzorkem, počtem akumulovaných spekter jednotlivých laserových pulsů a v neposlední řadě ionizačním chováním molekul jednotlivých analytů.

4.3.3. Technika LC-MALDI-TOF/TOF

Pro identifikaci velkého množství komponent vzorku, které nejsou jednotlivě v komplexním hmotnostním spektru rozlišitelné, je nutné složky takového složitěho vzorku rozdělit a analyzovat po částech. K tomuto dělení je možné využít například kapalinovou chromatografii na obrácené fázi s gradientovou elucí. Eluát ze separační kolony je pomocí robotického sběrače frakcí deponován společně s matricí na MALDI desku. V této práci byla využita deska AnchorChip se 384 pozicemi, na kterou byl eluát sbírán po 15sekundových frakcích v průběhu 96minutového gradientu (v čase 11 – 107 minut od nástřiku vzorku do HPLC systému).

Pro ilustraci celého průběhu činnosti LC-MALDI-MS/MS systému slouží následující příklad (Obr. 25, str. 74). V panelu A je záznam signálu (při $\lambda = 218$ nm) spektrofotometru HPLC systému, který měřil absorbanci eluátu ze separační kolony před jeho depozicí na MALDI desku. Vzorek nanesený na desce byl následně analyzován MALDI-TOF hmotnostním spektrometrem v MS režimu. Paralelně k UV chromatogramu je v panelu B zobrazen „virtuální MS chromatogram“, rekonstruovaný na základě sumárních intenzit (celkových iontových proudů) při MS měření a znalosti časů a pořadí depozice elučních



Obr. 25: Průběhu LC-MALDI-TOF/TOF analýzy. A – UV (218 nm) chromatogram eluátu vzorku, B – „virtuální chromatogram“ vzorku rekonstruovaný na základě intenzit signálů MS spekter, C – MS spektrum z jedné pozice MALDI desky (červenými kosočtverci jsou označeny všechny ionty, které byly z této pozice fragmentovány; ve vloženém panelu je detail isotopové mikroheterogenity označeného píku), D – fragmentační spektrum iontu 1476,707 (vlastní pík rodičovského iontu byl oříznut).

frakcí na jednotlivé pozice desky. Ve srovnání panelů A a B je patrná značná shoda MS signálů a reálného UV chromatogramu s drobným opožděním retenčních časů signálů MS chromatogramu v důsledku časové prodlevy, nutné pro transport eluovaných peptidů od UV detektoru ke sběrači frakcí.

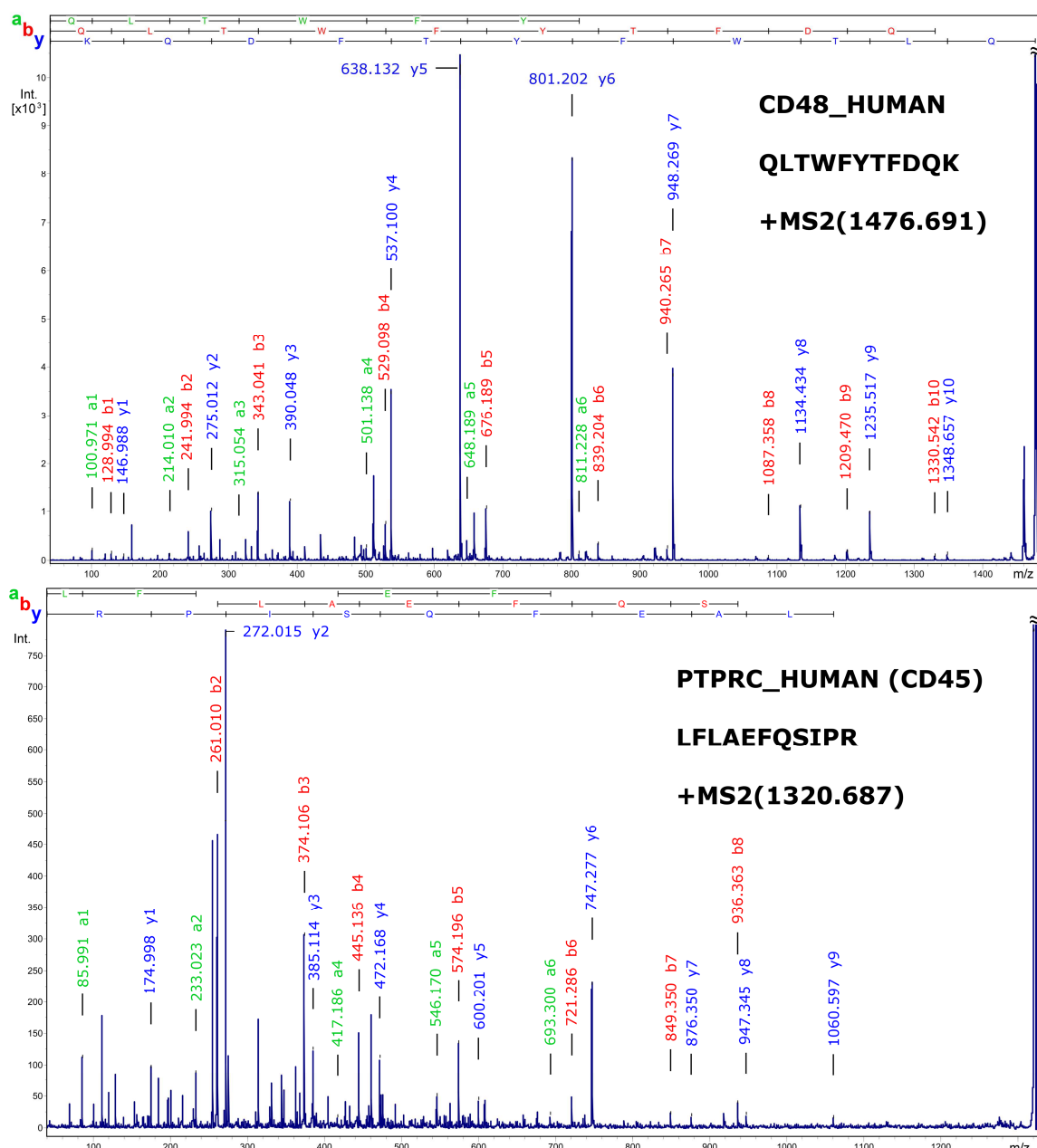
V rekonstruovaném MS chromatogramu je vyznačen úsek odpovídající jedné pozici MALDI desky a z ní získané MS spektrum je ukázáno v panelu C. Píky veškerých iontů, které byly z této pozice desky následně použity pro fragmentaci jsou ve spektru označeny červeným kosočtvercem. Ve vloženém panelu je ukázána bližší struktura zvýrazněného píku s monoisotopickým m/z 1476.707. Pozorovaná mikroheterogenita píku je způsobena přítomností různých isotopomerů v populaci iontů daného analytu. Zde ukázané štěpení signálu spektra je důsledkem přítomnosti různého počtu atomů uhlíku ^{13}C v jednotlivých molekulách. Vliv isotopů ostatních prvků vyskytujících se v molekulách analytu není při rozlišení použitého spektrometru patrný.

Na příkladu prekursorového píku o m/z 1476.707 je v panelu D ukázáno MS/MS fragmentační spektrum. Prekursorový pík byl ve spektru oříznut, aby byly dobře patrné vzniklé fragmentové ionty, na jejichž základě byla dále prováděna identifikace peptidů a následně proteinů přítomných ve vzorku. Celkově byl při analýze každého vzorku z 384 pozic MALDI desky získán soubor dat čítající 1000 až 10000 MS a MS/MS spekter.

4.3.4. Identifikace MS/MS fragmentových spekter

Interpretace MS/MS spekter peptidů, a na jejich základě provedená identifikace proteinů ve vzorku, byla provedena algoritmem Mascot. Reálná fragmentační spektra peptidů byla porovnávána oproti predikovaným možným fragmentačním spektrům peptidů, vzniklých *in silico* simulovanou proteolýzou neredundantní databáze proteinových primárních struktur UniProtKB/SwissProt, a bylo zkoumáno, jaký teoretický peptid nejpravděpodobněji poskytne fragmentační spektrum shodné se spektrem reálně získaným. Při porovnávání spekter byl primárně sledován výskyt *a*, *b* a *y* iontových sérií, doplněný o ionty se ztrátou H_2O či NH_3 , interní fragmenty a satelitní ionty. Na příkladu interpretovaných a anotovaných MS/MS spekter peptidů (Obr. 26, str. 76), pocházejících z CD48 povrchového buněčného antigenu a transmembránové protein tyrosin fosfatasy CD45, je ukázán princip identifikace na základě peptidového mikrosekvenování. Z diferencí mezi píky příslušné iontové série (ve spektrech pro přehlednost anotovány pouze základní *a*, *b*, *y* série) je možné v ideálním případě přímo odečíst primární sekvenci

peptidu v přímém směru (série *a*, *b*) či v obráceném pořadí (série *y*) a ověřit tak identifikaci provedenou algoritmem na základě shody s modelovaným fragmentačním spektrem.



Obr. 26: Příklad automaticky interpretovaných a anotovaných MS/MS spekter. Peptidy pocházejí z CD48 buněčného antigenu resp. CD45 protein tyrosin fosfatasy receptorového typu. Identifikace spekter provedena algoritmem Mascot. Pro přehlednost byly anotovány pouze píky základních iontových sérií *a*, *b*, *y*. Píky rodičovských iontů byly oříznuty.

4.3.5. Identifikace proteinů ve vzorku

Na základě jednotlivých identifikovaných peptidů byla za využití algoritmu Mascot provedena identifikace proteinů přítomných ve vzorku před proteolýzou. Jelikož byly automatizovaně porovnávány rozsáhlé datové soubory, čítající po spojení datových souborů opakovaných analýz stejného vzorku i více než 15000 částečně redundantních MS/MS spekter oproti databázi, čítající cca 20300 lidských proteinů, bylo využito

skórovacího systému MudPIT (blíže viz části 1.4.4 a 3.2.13 této práce). Pro nezávislou statistickou validaci a určení míry spolehlivosti identifikačních výsledků bylo použito metody klamné („decoy“) databáze (viz část 1.4.5 této práce). Procento falešně pozitivních výsledků se u všech souborů identifikovaných proteinů pohybovalo mezi 0,5 – 2,0 %.

Výběr některých proteinů, které byly za různých podmínek izolace DRM identifikovány ve frakci II (spojené frakce 2+3+4 sacharosového gradientu) shrnuje tabulka (Tab. 7, str. 78 – 9), ve které jsou zastoupeny některé vybrané proteiny různých funkčních kategorií (kompletní seznam identifikovaných proteinů v jednotlivých podmínkách izolace DRM viz Příloha č. 2 této práce). U části proteinů (jako např. CD45 či β -podjednotka ATP synthasy) nemá na identifikaci zásadní vliv použitý způsob zpracování vzorku (štěpení trypsinem v roztoku sacharosy z gradientu či srážení a purifikace proteinové složky a následné štěpení CNBr a trypsinem) a pokud byl protein identifikován za určitých podmínek, v komplementárních podmínkách zpracování je taktéž identifikovaný s obdobným pokrytím sekvence (SC). Nicméně u některých proteinů, jakými jsou například α 2-podjednotka G-proteinů, nekonvenční myosin-Ig či kinas rodiny Src (Fgr, Fyn, Lck, Lyn), se pro identifikaci jeví jako vhodnější jednodušší zpracování vzorku přímým štěpením v gradientu. Naopak, pro určité proteiny (jako je např. α -podjednotka ATP synthasy) se jeví jako vhodnější štěpení po srážení a purifikaci proteinů.

Jasně patrná závislost identifikace určitých proteinů (a počtu jim příslušných peptidů spolu s pokrytím sekvence) na detergentu použitém pro solubilizaci membrány je dokumentována v tabulce (Tab. 7, str. 78 – 9). Ve většině případů (s výjimkou například klathrinu) se jedná o proteiny, které byly identifikovány za použití Brij-98, ale v DRM poskytnutých Tritonem X-100 bylo jejich peptidů přítomno podstatně méně či chyběly úplně. Jasnými příklady výše uvedeného chování jsou například α - i β -podjednotky ATP synthasy, napěťově řízený kanál VDAC1, integrinový pár CD11a a CD18, protein fosfatasa CD45 či transferinový receptor CD71. Poslední zmíněný receptor je všeobecně považován za markerový protein nepřítomný v membránových raftech.^{/46,64/} Jeho výskyt primárně v Brijových DRM je v kontrastu s na detergentu nezávislým výskytem proteinů typických pro membránové rafty, jako je například rodina tyrosin kinas Src či membrány organizující protein flotilin.

Tab. 7: Seznam některých vybraných proteinů identifikovaných v DRM frakcích sacharosového gradientu. (část 1)

Protein	Přístupový kód	Membránová asociace	Skóre	MW [kDa]	SC [%]	# pept.	Podmínky
Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	GNAI2_HUMAN	diacylace	437	40.43	22.25	14	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			137	40.43	14.08	5	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			170	40.43	25.35	16	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			66	40.43	11.83	3	NK92MI, 1% TX-100, CNBr/Tryp
			86	40.43	9.01	2	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATPA_HUMAN	periferní	1231	59.71	22.60	20	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			1153	59.71	58.95	49	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			43	59.71	7.78	2	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			207	59.71	21.34	10	NK92MI, 1% TX-100, CNBr/Tryp
			74	59.71	8.86	4	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_HUMAN	periferní	1143	56.52	36.29	33	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			1144	56.52	53.12	37	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			54	56.52	7.56	2	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			122	56.52	23.25	9	NK92MI, 1% TX-100, CNBr/Tryp
			927	30.75	72.79	26	NK92MI, 1% B-98, Tryp
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1_HUMAN	multipass TM	637	30.75	51.94	24	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			156	30.75	21.55	5	NK92MI, 1% TX-100, CNBr/Tryp
			42	30.75	3.53	2	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			69	274.20	0.40	3	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			75	274.20	1.16	5	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
Cation-independent mannose-6-phosphate receptor (CD222)	MPRI_HUMAN	singlepass TM	42	274.20	0.44	2	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			42	81.49	3.37	2	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			76	81.49	2.16	3	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			184	27.67	4.53	3	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			78	27.67	11.11	3	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
CD44 antigen	CD44_HUMAN	singlepass TM	312	27.67	20.99	13	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			41	27.67	5.76	1	NK92MI, 1% TX-100, CNBr/Tryp
			151	25.62	12.18	11	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			88	25.62	12.18	4	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			345	128.69	6.07	11	NK92MI, 1% B-98, Tryp
Integrin alpha-L (CD11a)	ITAL_HUMAN	singlepass TM	49	128.69	7.95	9	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			75	128.69	1.20	1	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			115	84.73	4.94	4	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			161	84.73	9.88	8	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			119	84.73	4.81	3	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
Integrin beta-2 (CD18)	ITB2_HUMAN	singlepass TM	61	62.51	2.67	2	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			111	62.51	5.69	4	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			47	94.52	1.40	1	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			43	94.52	5.24	3	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			129	53.99	10.86	9	NK92MI, 1% B-98, Tryp
Matrix metalloproteinase-25	MMP25_HUMAN	GPI kotva	53	53.99	5.22	1	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			157	17.73	44.72	5	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			44	17.73	15.53	2	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			75	17.73	26.09	3	NK92MI, 1% TX-100, CNBr/Tryp
			80	13.50	12.00	3	NK92MI, 1% B-98, Tryp
Neural cell adhesion molecule 1 (CD56)	NCAM1_HUMAN	singlepass TM + GPI	75	13.50	9.60	1	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			72	13.61	8.06	3	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			57	13.61	25.81	4	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			228	147.16	7.36	15	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			186	147.16	7.29	10	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	P4K2A_HUMAN	?	134	147.16	3.76	5	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			111	74.78	6.61	7	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			113	74.78	6.16	4	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			49	42.47	7.75	4	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			90	42.47	7.75	3	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
Ragulator complex protein LAMTOR1	LTOR1_HUMAN	monoacylace	108	42.47	19.12	13	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			1001	84.82	19.87	30	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			368	84.82	20.66	21	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			50	84.82	4.47	2	NK92MI, 1% TX-100, CNBr/Tryp
			117	29.45	3.97	4	NK92MI, 1% B-98, Tryp
Ragulator complex protein LAMTOR2	LTOR2_HUMAN	periferní	44	29.45	3.97	2	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			106	59.44	5.86	5	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			41	59.44	2.65	1	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			187	60.72	16.39	9	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			56	60.72	5.03	5	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
Ragulator complex protein LAMTOR3	LTOR3_HUMAN	periferní	185	57.96	9.82	6	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			64	57.96	9.23	6	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			140	58.54	17.38	11	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			65	58.54	5.86	6	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			381	41.71	34.13	19	NK92MI, 1% B-98, Tryp
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C (CD45)	PTPRC_HUMAN	singlepass TM	1097	41.71	55.73	35	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			791	41.71	37.07	29	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			459	41.71	37.87	16	NK92MI, 1% TX-100, CNBr/Tryp
			1286	41.71	54.67	44	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			103	41.71	16.53	4	NK92MI, 1% TX-100, CNBr/Tryp
Semaphorin-7A (CD108)	SEM7A_HUMAN	GPI kotva	151	191.49	5.61	8	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			242	191.49	7.82	11	NK92MI, 1% TX-100, CNBr/Tryp
Signal-regulatory protein gamma (CD172g)	SIRPG_HUMAN	singlepass TM					
Transferrin receptor protein 1 (CD71)	TFR1_HUMAN	singlepass TM + diacylace					
Transmembrane protein 55B	TM55B_HUMAN	multipass TM					
Tyrosine-protein kinase Fgr	FGR_HUMAN	triacylace					
Tyrosine-protein kinase Fyn	FYN_HUMAN	triacylace					
Tyrosine-protein kinase Lck	LCK_HUMAN	triacylace					
Tyrosine-protein kinase Lyn	LYN_HUMAN	diacylace					
Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	?					
Clathrin heavy chain 1	CLH1_HUMAN	periferní					

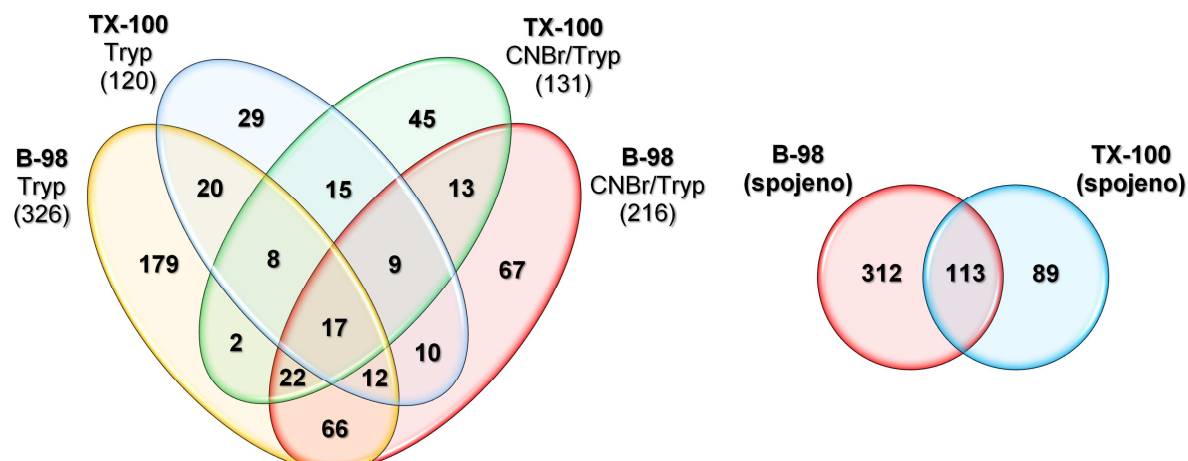
Pozn.: Přístupový kód je pro databázi UniProt, MW – molekulová hmotnost proteinu, SC – pokrytí sekvence proteinu identifikovanými peptidy, # pept. – počet přiřazených identifikovaných peptidů (částečně redundantní). Singlepass TM – TM protein jednou procházející membránou, multipass TM – TM protein vícenásobně procházející membránou.

Tab. 7: Seznam některých vybraných proteinů identifikovaných v DRM frakcích sacharosového gradientu. (část 2)

Protein	Přístupový kód	Membránová asociace	Skóre	MW [kDa]	SC [%]	# pept.	Podmínky
Erythrocyte band 7 integral membrane protein	STOM_HUMAN	diacylace	162	31.71	21.53	6	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			269	31.71	38.54	13	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			59	31.71	18.75	5	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			126	31.71	26.74	8	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
Flotillin-1	FLOT1_HUMAN	periferní	73	47.33	7.26	3	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			161	47.33	30.68	12	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			270	47.33	27.63	14	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			118	47.33	14.52	5	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
Flotillin-2	FLOT2_HUMAN	periferní	54	47.03	9.11	3	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			80	47.03	11.92	11	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
Lymphocyte-specific protein 1	LSP1_HUMAN	periferní	183	37.17	5.01	4	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			191	37.17	14.16	4	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			127	37.17	15.34	4	NK92MI, 1% TX-100, CNBr/Tryp
Protein ERGIC-53	LMAN1_HUMAN	singlepass TM	118	57.51	5.69	3	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			43	57.51	8.43	4	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			93	57.51	2.55	2	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			63	57.51	2.55	1	NK92MI, 1% TX-100, CNBr/Tryp
Unconventional myosin-Ig	MYO1G_HUMAN	periferní	627	116.37	17.88	23	NK92MI, 1% B-98, Tryp
			62	116.37	2.26	2	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			252	116.37	18.86	21	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			109	116.37	8.55	6	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
Vesicle-associated membrane protein 2	VAMP2_HUMAN	singlepass TM	171	12.65	25.86	3	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			59	12.65	25.00	2	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			84	12.65	25.86	2	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
			43	28.98	10.31	2	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
Granzyme A	GRAA_HUMAN	?	77	28.98	19.08	6	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			76	27.70	7.69	2	NK92MI, 1% B-98, CNBr/Tryp
Granzyme B	GRAB_HUMAN	?	49	27.70	8.91	5	NK92MI, 1% TX-100, Tryp
			189	27.70	10.93	4	NK92MI, 1% TX-100, CNBr/Tryp

Pozn.: Přístupový kód je pro databázi UniProt, MW – molekulová hmotnost proteinu, SC – pokrytí sekvence proteinu identifikovanými peptidy, # pept. – počet přiřazených identifikovaných peptidů (částečně redundantní). Singlepass TM – TM protein jednou procházející membránou, multipass TM – TM protein vícenásobně procházející membránou.

Výskyt proteinů ve vzorku za různých podmínek solubilizace je pro všechny proteiny identifikované na linii NK-92MI přehledně znázorněn formou Vennových množinových diagramů pro všechny 4 podmínky solubilizace i ve zjednodušené formě – pouze na základě použitého detergentu, nehledě na metodu přípravy vzorku a digesce (Obr. 27). Z celkového neredundantního počtu 514 identifikovaných proteinů se 194 současně vyskytuje v alespoň dvou podmínkách izolace, z čehož 66 proteinů se vyskytuje pouze v preparacích pomocí Brij-98 a nebylo identifikováno v Tritonových DRM. Ve srovnání detergentů je 113 proteinů identifikovaných současně v Tritonových i Brijových preparacích, zatímco pouze v Briju bylo identifikováno 312 proteinů, oproti 89 proteinům identifikovaným pouze v Tritonu.



Obr. 27: Proteiny identifikované v DRM frakcích buněk linie NK-92MI. Vennův diagram znázorněn pro jednotlivé podmínky izolace, přípravy vzorku a digesce i pouze pro podmínky izolace. TX-100 – 1% Triton X-100, B-98 – 1% Brij-98.

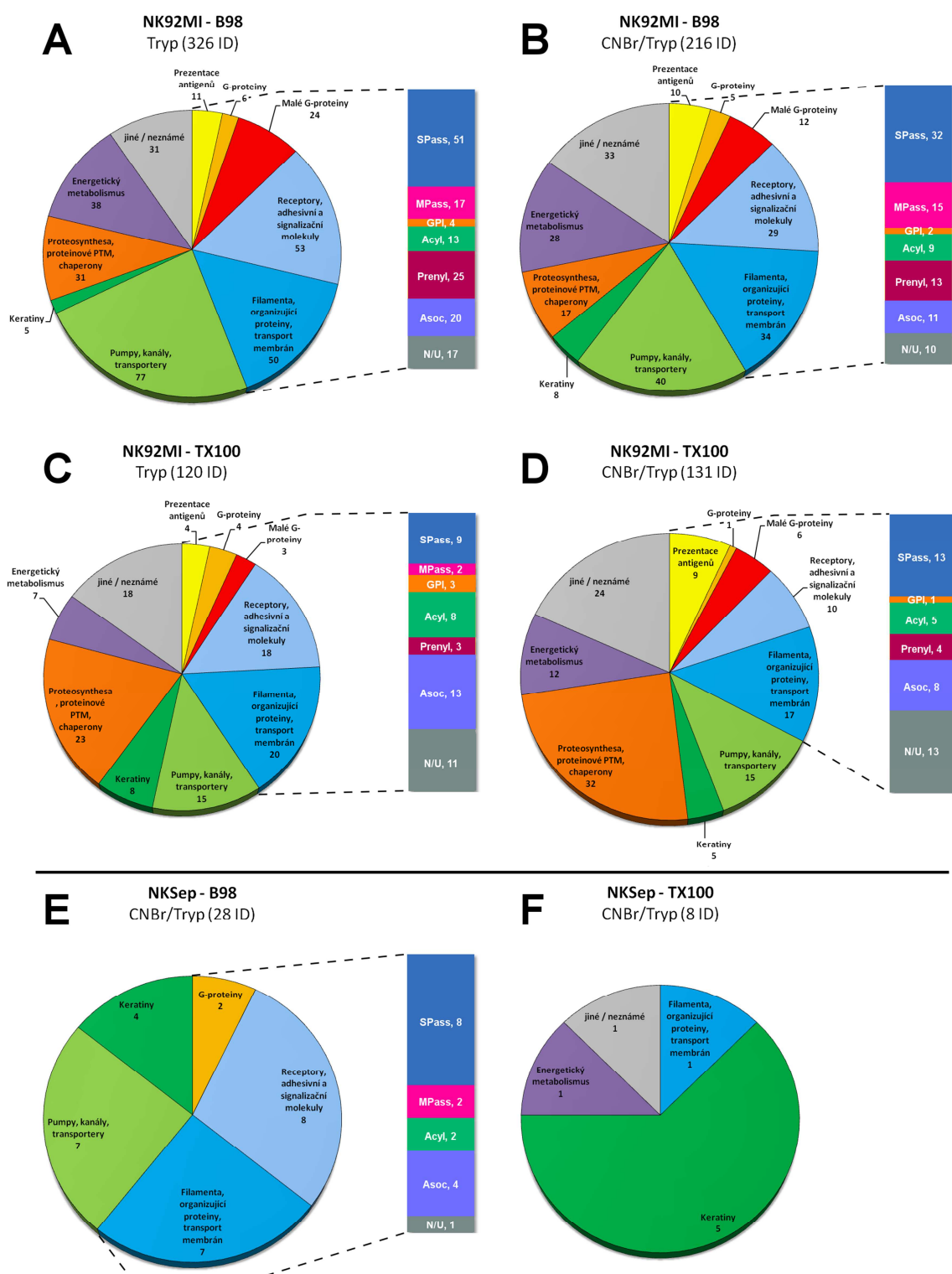
V koláčových grafech (Obr. 28, str. 81) jsou veškeré proteiny, identifikované ve frakcích II (spojené frakce 2+3+4 sacharosového gradientu obsahující DRM), pro jednotlivé podmínky izolace rozděleny podle své známé či predikované funkce dle databáze UniProt. Kategorie molekul, zajímavé z hlediska své potenciální interakce s membránovými rafty (signalizační molekuly a adhesivní molekuly, receptory, proteiny účastnící se filamentární organizace či vnitrobuněčného hospodaření s membránami) jsou též pro jednotlivé podmínky izolace rozděleny dle své známé interakce s membránou.

Při srovnání podmínek zpracování a proteolytické digesce vzorků se v rámci určitého detergentu procentuelní zastoupení jednotlivých kategorií proteinů ani druh jejich membránové asociace příliš neliší (viz Obr. 28, str. 81, panely A/B, C/D). V preparacích pomocí Brij-98 je určitá odlišnost pouze v podílu zastoupení proteinů typu membránových pump, kanálů a transporterů (panely A, B) a v preparacích pomocí Tritonu X-100 naopak v zastoupení proteinů proteosyntetického aparátu a receptorů, adhesivních a signalizačních molekul (panely C, D). Zásadnější rozdíly jsou patrné při srovnání obou použitých detergentů. Preparace pomocí Brij-98 poskytují oproti Tritonu X-100 podstatně vyšší procento proteinů typu membránových kanálů, pump a transporterů, zatímco v preparacích pomocí Tritonu je zvýšený podíl proteosyntetických proteinů (panely AB / CD). Preparace pomocí Tritonu také poskytují menší procento malých G-proteinů. Zajímavý je též podíl keratinů (typických kontaminujících proteinů nechtěně zanesených do vzorku ve formě prachu či mikroskopických kousků pokožky) mezi identifikacemi v jednotlivých vzorcích. Ve všech preparacích je co do absolutního počtu identifikovaných keratinů situace přibližně stejná, ovšem příslušný podíl keratinů na identifikacích proteinů ve vzorku se podstatně mění dle celkového počtu identifikovaných proteinů v daném vzorku.

Zásadní odlišnosti jsou též zřejmé z hlediska druhu membránové interakce u proteinů příslušejících do vybraných funkčních kategorií (Obr. 28, str. 81, sloupcové grafy). Ve srovnání jednotlivých podmínek digesce je situace opět obdobná jako u funkčního srovnání identifikovaných proteinů, ovšem ve srovnání jednotlivých použitých detergentů je patrný radikální úbytek transmembránových proteinů s vícenásobným průchodem membránou (označeny zkratkou „MPass“), stejně jako prenylovaných proteinů v preparacích pomocí Tritonu X-100.

U NK buněk separovaných z krve neleukemických dárců byl získán pouze malý počet identifikací u DRM separovaných pomocí Brij-98, a s výjimkou aktinu pouze identifikace kontaminujících proteinů v případě izolace DRM pomocí Tritonu X-100 (panely E, F).

Proteiny identifikované pomocí solubilizace Brijem byly ve všech případech totožné nebo blízce příbuzné s vysoce abundantními proteiny identifikovanými na linii NK-92MI (viz Tab. 7, str. 78 – 9 a příloha č. 2).



Obr. 28: Rozdělení proteinů identifikovaných v DRM frakcích sacharosového gradientu na základě jejich funkce a membránové asociace. Panely A – D: buňky linie NK-92MI, panely E – F: NK buňky separované z krve neleukemických dárců. TX-100 – solubilizace 1% Tritonem X-100, B-98 – solubilizace 1% Brijem-98. Membránová asociace byla zkoumána pouze u vybraných funkčních kategorií proteinů. SPass – TM protein jednou procházející membránou, MPass – TM protein vícenásobně procházející membránou, GPI – protein vázaný na GPI kotvu, Acyl – protein jednou či vícenásobně acylovaný, Prenyl – protein jednou či vícenásobně prenylovaný, Asoc – periferní membránový protein či protein asociovaný s membránovým proteinem, N/U – protein neasociovaný s membránou či s neznámou membránovou asociací.

5. DISKUSE

Teorie membránových mikrodomén (raftů) se v posledním desetiletí postupně prosazuje do popředí výzkumu struktury biologických membrán. S membránovými rafty a jimi regulovanou činností membránových proteinů je spojováno mnoho různých biologických buněčných funkcí, mezi které patří například buněčná signalizace, exo/endocytosa či buněčná polarizace.^{/46/} V Laboratoři charakterizace molekulární struktury MBÚ AV ČR, v.v.i. již byla za pomoci hmotnostní spektrometrie provedena proteomická charakterizace membránových mikrodomén přirozených zabíječských (NK) buněk na krysím modelu^{/57/} a membránových mikrodomén lidských T lymfocytů^{/96/}. Jelikož jsou NK buňky klíčovou komponentou přirozené imunity, byla proteomická charakterizace membránových mikrodomén lidských NK buněk zvolena za cíl této práce. V důsledku určitých známých odlišností mezi NK buňkami liniového původu a NK buňkami v periferní krvi neleukemických dárců byly též podniknuty snahy o proteomické srovnání těchto dvou druhů NK buněk.

Kultivace lidské buněčné linie NK-92MI za účelem získání čistých NK buněk pro proteomickou analýzu probíhala bez větších potíží a buňky stimulované lidským IL-2 expandovaly do počtů požadovaných pro analýzu. Pokusy o obdobnou expansi NK buněk z krve neleukemických lidských dárců ovšem ani při testování několika různých expansních systémů za různých podmínek nevedly k požadovaným úrovním NK buněčných proliferací. Možným důvodem nemožnosti reprodukovat výsledky expansních protokolů publikovaných v literatuře^{/20,31,34/} je obzvláštní náchylnost NK buněk na kultivační podmínky. Oproti nejlepším publikovaným podmínkám pro expansi NK buněk v NKAES kultuře nebylo v podmínkách této práce použito CellGro médium pro kultivace kmenových buněk. Nedostatek určitých kostimulačních faktorů nezbytných pro proliferaci mohl mít za následek odumření větší části buněk v kultuře po několika dnech kultivace.

V důsledku nemožnosti získání velkých počtů NK buněk kultivací bylo přistoupeno k imunomagnetické izolaci NK buněk z krve většího počtu dárců. Tato technika se ukázala jako účinná a poskytovala čisté preparáty NK buněk s velmi dobrou viabilitou. Nevýhodou se ovšem ukázala nutnost provést větší počet izolací od různých dárců, jelikož počty NK buněk získané z jednoho dárce nebyly dostatečné pro další analýzu. Provedení isopyknické flotační separace detergentu-rezistentních membrán (DRM) odděleně pro jednotlivé dárce (a následné spojení frakcí gradientu) by nemělo představovat problém, jelikož menší

množství membránového materiálu při jednotlivých centrifugacích by mělo vést spíše k lepší separaci vzorku.

V jednotlivých frakcích sacharosového gradientu použitého pro separaci DRM byl sledován obecný proteinový profil pomocí polyakrylamidové gelové elektroforesy v prostředí SDS, stejně jako výskyt konkrétních proteinů pomocí techniky elektropřenosu s imunodetekcí proteinů specifickými protilátkami. Z výsledků SDS-PAGE je patrné, že vrchní frakce gradientu (2 – 4) obsahují určité množství proteinů, a že proteinový profil získaný pomocí 1% detergentu Triton X-100 je odlišný oproti profilu získanému pomocí 1% detergentu Brij-98. Triton X-100 se obecně jevil při solubilizaci membrán jako více stringentní detergent, jelikož větší část proteinů než u Brije-98 byla přítomna v nejspodnějších frakcích sacharosového gradientu.

Při elektropřenosu proteinů byly jako referenční proteiny sledovány kinasa Lck (protein se známou asociací s membránovými rafty) a α -tubulin (protein spolupůsící cytoskeletární mikrotubula, bez známé interakce s membránovými rafty). Výskyt Lck kinasy ve vrchních frakcích gradientu potvrdil předpokládaný výskyt proteinů DRM ve frakcích 2 – 4 sacharosového gradientu. Částečná přítomnost Lck kinasy v horních i spodních frakcích gradientu při solubilizaci membrán buněk linie NK-92MI pomocí Tritonu X-100 též naznačuje, že membránové mikrodomény nejsou homogenní strukturou. Rozdílné chování Lck kinasy při solubilizaci membrán separovaných a liniových NK buněk také může ukazovat na rozdílné vlastnosti membránových mikrodomén (a potažmo DRM) mezi jednotlivými subtypy NK buněk či jejich signalizačními a diferenciačními stavy. Tato zjištění odpovídají možným variantám teorie struktury membránových raftů^{/48/} i výsledkům získaným jinými skupinami^{/59,61/}. Nespojité distribuce Lck kinasy v rámci gradientu při solubilizaci membrán buněk linie NK-92MI pomocí Tritonu by též mohla být náznakem heterogenity struktury membránových mikrodomén v rámci buňky. Tato myšlenka je ovšem prozatím pouze hypotetického charakteru a bude případně muset být ověřena dalšími experimenty. Slabé signály Lck kinasy a tubulinu (až nedetekovatelné v případě Tritonové preparace DRM) u separovaných neliniových NK buněk též ukazují, že bylo v případě těchto buněk získáno v membránové frakci podstatně méně proteinu než v případě NK-92MI linie. Velmi slabé signály při detekci tubulinu by též mohly být vysvětlitelné přítomností mutace či modifikace tubulinu v epitopu rozpoznávaném protilátkou. Fyziologicky je toto ovšem nepravděpodobné, jelikož rozpoznávaný epitop tubulinu je velmi evolučně konzervován.^{/97/}

Proteomická analýza spojených frakcí sacharosového gradientu 2+3+4 (obsahujících DRM) byla prováděna pomocí hmotnostní spektrometrie technikou LC-MALDI-MS/MS. Identifikace proteinů přítomných ve vzorku byly provedeny algoritmem Mascot na základě identifikací proteolytických peptidů, vzniklých štěpením proteinů ve vzorku trypsinem či CNBr a trypsinem. Fragmentační spektra peptidů, experimentálně získaná pomocí hmotnostního spektrometru typu MALDI-TOF/TOF, byla algoritmem porovnávána oproti peptidovým fragmentačním spektrům, simulovaným na základě proteinů databáze SwissProt. Ačkoli u automatizovaných hmotnostně spektrometrických technik identifikace proteinů není možné zaručit naprostou jednoznačnost a správnost identifikací, bylo pro ověření práce identifikačního algoritmu využito metody klamné databáze. Tímto bioinformatickým postupem bylo určeno procento falešně pozitivních identifikací mezi výsledky získanými pomocí identifikačního algoritmu. To zvyšuje míru jistoty ohledně správnosti identifikačních výsledků a umožňuje jejich objektivní srovnání s výsledky získanými jinými algoritmy.

Odstranění detergentu a dalších nežádoucích látek z peptidových vzorků pro hmotnostní spektrometrii bylo úspěšně provedeno metodou promytí chloroformem na MacroTrap mikrokolonce.^{/92/} Na základě hmotnostních spekter vzorků směsí peptidových štěpů proteinů v jednotlivých frakcích gradientu bylo v souladu s výsledky získanými SDS elektroforezou ukázáno, že při použití detergentu Brij-98 je frakce DRM, flotující v gradientu v oblasti s nižší hustotou, proteinově bohatší než u detergentu Triton X-100.

Na základě proteomických MS/MS analýz vzorků spojených frakcí 2+3+4 sacharosového gradientu byly pro jednotlivé podmínky izolace a proteolýzy DRM sestaveny seznamy proteinů identifikovaných ve vzorku. Dle srovnání výskytu jednotlivých identifikovaných proteinů mezi podmínkami izolace a digesce DRM byla potvrzena předchozí pozorování pomocí jiných experimentálních metod, týkající se selektivity detergentů při izolaci DRM. Brij-98 je dle výrazně vyššího počtu proteinů, identifikovaných pouze za jeho využití a nevyskytujících se v přípravách pomocí Tritonu, zjevně méně selektivní než Triton X-100 při extrakci DRM, případně extrahuje v rámci DRM jiný typ membránových raftů, jak bylo navrženo jinými skupinami.^{/48,59,64/}

Při bližším pohledu na jednotlivé identifikované proteiny a jejich rozřazení do funkčních kategorií dle databáze UniProt, byly pozorovány určité trendy v závislosti na detergentu použitém pro solubilizaci membrán a metodě zpracování vzorků DRM. V tomto místě je vhodné podotknout, že technika MALDI-MS není bez speciálních

experimentálních uspořádání vhodná pro kvantifikaci výskytu jednotlivých analytů. V případě této práce byly využity pouze hrubé odhady zastoupení daného proteinu v určitém vzorku na základě počtu přiřazených peptidů a pokrytí primární sekvence proteinu přiřazenými identifikovanými peptidy. Navíc nebylo cílem této práce přesně určit kvantitativní profily jednotlivých proteinů v preparacích, ale pouze upozornit na některé výrazné závislosti identifikace proteinů v závislosti na experimentálních podmínkách. Případné přesné sledování změn kvantitativních parametrů výskytu určitých proteinů ve vzorku DRM, například v závislosti na určité stimulaci buněk, by bylo možné, ovšem bylo by nutné využít komplexní experimentální přístupy, jako je například značení vzorků stabilními isotopovými značkami.^{/58/}

U způsobu zpracování a proteolytické digesce vzorků DRM nebyl pozorován žádný zásadní systematický rozdíl. Pro některé proteiny se dle získaných dat jeví vhodnější přímé štěpení trypsinem v sacharosovém gradientu, u kterého jsou pravděpodobné menší ztráty vzorku oproti postupu štěpení CNBr a následně trypsinem, při kterém dochází k podstatně složitější manipulaci se vzorkem. Na druhou stranu štěpení přímo v gradientu bez odstranění sacharosy a extrakce lipidů organickými rozpouštědly může limitovat přístupnost určitých částí molekul proteinů proteasám. Na tom, zda za určitých podmínek digesce bude daný peptid identifikován, může mít také vliv rozdíl délky či chromatografického a ionizačního chování tryptického (alespoň jedna bazická aminokyselina v peptidu), bromkyan-tryptického a bromkyanového peptidu. Vliv na signifikanci identifikace může mít též použitý vyhledávací algoritmus, který v případě štěpení CNBr a trypsinem pracuje s více variabilními modifikacemi, a tudíž se do výpočtu peptidového skóre může promítnout větší počet možných kandidátních peptidových sekvencí s danou m/z .

V závislosti identifikace proteinů na detergentu, použitém pro přípravu DRM, byl mezi jednotlivými podmínkami preparací pozorován rozdílný výskyt proteinů typu membránových pump, kanálů a transporterů či proteinů proteosyntetického aparátu. Druhé zmíněné, ač se v některých případech mohou vyskytovat na membráně ER či GA, jsou pravděpodobně pouze kontaminujícího / kopurifikujícího původu a jejich vyšší procento výskytu v preparacích Tritonových DRM může být pouze následkem nižšího celkového počtu proteinů, identifikovaných v těchto podmínkách preparace. Naopak u membránových pump, kanálů a transporterů se pravděpodobně může projevovat různá selektivita detergentů Brij a Triton při izolaci DRM. Tato rozdílná selektivita byla též pozorována na příkladu transferinového receptoru CD71. Ten byl značně zastoupen

v Brijových preparacích, ale velmi málo v preparacích Tritonových. Nabízí se dvě možná vysvětlení – Brij-98 není dostatečně specifický pro izolaci membránových raftů a DRM jím připravené obsahují CD71 coby kopurifikující protein nebo existuje více typů membránových raftů (či nehomogenní uspořádání jednoho typu raftu), izolovaných pomocí různých detergentů, z nichž v některých se tento protein vyskytuje a v jiných nikoliv.

Byl též pozorován vliv použitého detergentu na výskyt identifikovaných proteinů s určitým druhem interakce s membránou. Pozorovaný pokles výskytu prenylovaných proteinů v preparacích pomocí Tritonu X-100 koreluje s úbytkem malých G-proteinů, které jsou z proteinů, u nichž byla zkoumána asociace s membránou (viz Příloha č. 2), prakticky jedinými nositeli posttranslačních modifikací prenylového typu. Pokles přítomnosti proteinů vícenásobně procházejících membránou v preparacích pomocí Tritonu X-100 lze vysledovat k proteinům spadajícím do kategorie filamentární organizace a transportu membránových vesikul a částečně do kategorie receptorů, adhesivních a signalizačních molekul (Příloha č. 2 této práce). Toto by mohlo mít i přímou implikaci na výše zmíněný případ proteinů typu membránových pump, transporterů a kanálů, které, ač sice v této práci jednotlivě z hlediska interakce s membránou necharakterizované, jsou často transmembránové s vícenásobným průchodem membránou (typ III TM proteinu).

U některých proteinů identifikovaných v DRM membránové frakci může být na první pohled nejasná jejich interakce s plasmatickou membránou či membránovými rafty. Příkladem mohou být podjednotky ATP synthasy (typického mitochondriálního proteinu), aktinu (typického cytoskeletárního proteinu) či nekonvenčního myosinu-Ig. V případě ATP synthasy již bylo ovšem ukázáno, že se vyskytuje i na povrchu buněk.^{/57,98/} Aktinová vlákna, zdá se, hrají roli při dynamické organizaci membránových raftů^{/43,46,55/}, které by se mohly účastnit i nekonvenční molekulární motory myosinového typu. O těch je známo, že částí své molekuly interagují s membránou. Rozlišení kopurifikujících proteinů a pravých proteinů membránových raftů ovšem není s použitými metodikami exaktně možné. Pro lepší, ač ne dokonalé, oddělení těchto skupin proteinů by mohlo být vhodné využít experimentální techniky založené na rozrušení membránových raftů deplecí cholesterolu a kvantifikaci efektů této perturbace membrán pomocí isotopového značení proteinů.^{/58/} Přínosné též může být analyzování zbylých spojených frakcí gradientu (5+6 a 7+8) a sledování distribuce jednotlivých proteinů v rámci celého sacharosového gradientu.

Ač je známo, a v této práci bylo též ukázáno, že detergentu-rezistentní membrány obsahují proteiny, u kterých je známa jejich asociace s membránovými rafty, zůstává pro vědu stále nezodpovězena otázka, do jaké míry DRM odrážejí fyziologické aspekty

lipidových raftů přítomných na membránách buněk. Otázkou též zůstává, zda fyziologicky existuje v rámci buněčných membrán více typů membránových raftů, či zda jsou rozdíly mezi DRM připravenými pomocí různých detergentů arteficiální.

6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo proteomicky charakterizovat membránové mikrodomény lidských NK buněk, a to jak u buněk zavedené buněčné linie NK-92MI, tak u NK buněk získaných z krve neleukemických dárců. Dosažené výsledky je možno shrnout do několika bodů.

- Byly úspěšně kultivovány a expandovány buňky linie NK-92MI a pomocí detergentové solubilizace z nich byly izolovány detergentu-rezistentní membrány (DRM).
- Proteomická charakterizace DRM z buněk linie NK-92MI byla provedena hmotnostně spektrometrickou technikou LC-MALDI-TOF/TOF a byly srovnány různé postupy zpracování vzorků DRM.
- Bylo srovnáno proteinové složení DRM získaných z linie NK-92MI za pomoci detergentů Triton X-100 a Brij-98.
- Expanse lidských NK buněk neleukemického původu sice nebyla úspěšná, ale lidské NK buňky byly z krve neleukemických dárců úspěšně izolovány negativní imunomagnetickou separací.
- Proteomická charakterizace DRM lidských NK buněk neleukemického původu byla provedena za stejných podmínek jako u linie NK-92MI. Nicméně, v důsledku vyšší citlivosti membránových mikrodomén lidských NK buněk neleukemického původu vůči solubilizaci či v důsledku malého množství experimentálního materiálu nebylo získáno dostatečné množství dat pro srovnání s buňkami linie NK-92MI.

LITERATURA

- /1/ Du Pasquier, L.: *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 129, 1-15 (2001)
- /2/ Hořejší, V., Bartůňková, J.: *Základy imunologie*. Triton, Praha, Praha (2009)
- /3/ Trinchieri, G.: *Adv. Immunol.* 47, 187-376 (1989)
- /4/ Garcia-Lora, A., Algarra, I., Garrido, F.: *J. Cell. Physiol.* 195, 346-355 (2003)
- /5/ Boshkov, L.K., Macen, J.L., McFadden, G.: *J. Immunol.* 148, 881-887 (1992)
- /6/ Campo, M.S., Graham, S.V., Cortese, M.S., Ashrafi, G.H., Araibi, E.H., Dornan, E.S., Miners, K., Nunes, C., Man, S.: *Virology* 407, 137-142 (2010)
- /7/ Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S.: *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders - Elsevier, Philadelphia (2010)
- /8/ Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., Salazar-Mather, T.P.: *Annu. Rev. Immunol.* 17, 189-220 (1999)
- /9/ Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R., Phillips, J.H.: *J. Immunol.* 136, 4480-4486 (1986)
- /10/ Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A.: *Trends Immunol.* 22, 633-640 (2001)
- /11/ Chan, A., Hong, D.L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A.D., Buckley, C.D., McMichael, A., Enver, T., Bowness, P.: *J. Immunol.* 179, 89-94 (2007)
- /12/ Raulet, D.H., Vance, R.E.: *Nat. Rev. Immunol.* 6, 520-531 (2006)
- /13/ Malmberg, K.J., Bryceson, Y.T., Carlsten, M., Andersson, S., Bjorklund, A., Bjorkstrom, N.K., Baumann, B.C., Fauriat, C., Alici, E., Dilber, M.S., Ljunggren, H.G.: *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 1541-1552 (2008)
- /14/ Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., Brossay, L.: *Nat. Rev. Immunol.* 12, 239-252 (2012)
- /15/ Billadeau, D.D., Upshaw, J.L., Schoon, R.A., Dick, C.J., Leibson, P.J.: *Nat. Immunol.* 4, 557-564 (2003)
- /16/ Cullen, S.P., Martin, S.J.: *Cell Death Differ.* 15, 251-262 (2008)
- /17/ Trapani, J.A., Smyth, M.J.: *Nat. Rev. Immunol.* 2, 735-747 (2002)
- /18/ Eischen, C.M., Schilling, J.D., Lynch, D.H., Krammer, P.H., Leibson, P.J.: *J. Immunol.* 156, 2693-2699 (1996)
- /19/ Feng, X., Yan, J., Wang, Y., Zierath, J.R., Nordenskjold, M., Henter, J.I., Fadeel, B., Zheng, C.: *Mol. Immunol.* 47, 2388-2396 (2010)
- /20/ Fujisaki, H., Kakuda, H., Shimasaki, N., Imai, C., Ma, J., Lockey, T., Eldridge, P., Leung, W.H., Campana, D.: *Cancer Res.* 69, 4010-4017 (2009)
- /21/ Drexler, H.G., Matsuo, Y.: *Leukemia* 14, 777-782 (2000)
- /22/ Yodoi, J., Teshigawara, K., Nikaido, T., Fukui, K., Noma, T., Honjo, T., Takigawa, M., Sasaki, M., Minato, N., Tsudo, M., et al.: *J. Immunol.* 134, 1623-1630 (1985)
- /23/ Tam, Y.K., Maki, G., Miyagawa, B., Hennemann, B., Tonn, T., Klingemann, H.G.: *Hum. Gene Ther.* 10, 1359-1373 (1999)
- /24/ Alici, E., Sutlu, T., Bjorkstrand, B., Gilljam, M., Stellan, B., Nahi, H., Quezada, H.C., Gahrton, G., Ljunggren, H.G., Dilber, M.S.: *Blood* 111, 3155-3162 (2008)
- /25/ Cho, D., Campana, D.: *Korean J. Lab. Med.* 29, 89-96 (2009)
- /26/ Trinchieri, G., Matsumoto-Kobayashi, M., Clark, S.C., Sehra, J., London, L., Perussia, B.: *J. Exp. Med.* 160, 1147-1169 (1984)
- /27/ Guven, H., Gilljam, M., Chambers, B.J., Ljunggren, H.G., Christensson, B., Kimby, E., Dilber, M.S.: *Leukemia* 17, 1973-1980 (2003)
- /28/ Miltenyi Biotec GmbH: *NK Cell Activation/Expansion Kit (human) - product datasheet*, dostupné dne 3.4.2012 z http://www.miltenyibiotec.com/download/datasheets_en/1437/DS130-094-483.pdf
- /29/ Miller, J.S., Oelkers, S., Verfaillie, C., McGlave, P.: *Blood* 80, 2221-2229 (1992)
- /30/ Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W.A., Moretta, L., Munz, C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 16606-16611 (2004)
- /31/ Cella, M., Colonna, M.: *Methods Mol. Biol.* 121, 1-4 (2000)

- /32/ Dunne, J., Lynch, S., O'Farrelly, C., Todryk, S., Hegarty, J.E., Feighery, C., Doherty, D.G.: *J. Immunol.* **167**, 3129-3138 (2001)
- /33/ Carson, W.E., Fehniger, T.A., Haldar, S., Eckhert, K., Lindemann, M.J., Lai, C.F., Croce, C.M., Baumann, H., Caligiuri, M.A.: *J. Clin. Invest.* **99**, 937-943 (1997)
- /34/ Imai, C., Iwamoto, S., Campana, D.: *Blood* **106**, 376-383 (2005)
- /35/ Nagashima, S., Mailliard, R., Kashii, Y., Reichert, T.E., Herberman, R.B., Robbins, P., Whiteside, T.L.: *Blood* **91**, 3850-3861 (1998)
- /36/ Fujisaki, H., Kakuda, H., Imai, C., Mullighan, C.G., Campana, D.: *Br. J. Haematol.* **145**, 606-613 (2009)
- /37/ Chakir, H., Camilucci, A.A., Filion, L.G., Webb, J.R.: *J. Immunol.* **165**, 4985-4993 (2000)
- /38/ Seidl, J., Knuechel, R., Kunz-Schughart, L.A.: *Cytometry* **36**, 102-111 (1999)
- /39/ Oren, A., Husebo, C., Iversen, A.C., Austgulen, R.: *J. Immunol. Methods* **303**, 1-10 (2005)
- /40/ StemCell Technologies: *EasySep Human NK cell enrichment kit #19055 (negative selection) - product datasheet*, dostupné dne 5.4.2012 z http://www.stemcell.com/~media/Technical%20Resources/7/A/8/6/F/28745PIS_4_4_0.ashx
- /41/ eBioscience Inc.: *Human CD chart*, dostupné dne 5.4.2012 z <http://www.ebioscience.com/resources/human-cd-chart.htm>
- /42/ Gorter, E., Grendel, F.: *J. Exp. Med.* **41**, 439-443 (1925)
- /43/ Pike, L.J.: *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S323-328 (2009)
- /44/ Singer, S.J., Nicolson, G.L.: *Science* **175**, 720-731 (1972)
- /45/ Karnovsky, M.J., Kleinfeld, A.M., Hoover, R.L., Klausner, R.D.: *J. Cell. Biol.* **94**, 1-6 (1982)
- /46/ Simons, K., Sampaio, J.L.: *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004697 (2011)
- /47/ Voet, D., Voet, J.G.: *Biochemistry*, 3rd edition. J. Wiley & Sons, New York (2004)
- /48/ Pike, L.J.: *Biochem. J.* **378**, 281-292 (2004)
- /49/ Simons, K., Ikonen, E.: *Nature* **387**, 569-572 (1997)
- /50/ Pike, L.J.: *J. Lipid Res.* **44**, 655-667 (2003)
- /51/ Pike, L.J.: *J. Lipid Res.* **47**, 1597-1598 (2006)
- /52/ Munro, S.: *Cell* **115**, 377-388 (2003)
- /53/ Bacia, K., Scherfeld, D., Kahya, N., Schwille, P.: *Biophys. J.* **87**, 1034-1043 (2004)
- /54/ Kim, H.M., Jeong, B.H., Hyon, J.Y., An, M.J., Seo, M.S., Hong, J.H., Lee, K.J., Kim, C.H., Joo, T., Hong, S.C., Cho, B.R.: *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4246-4247 (2008)
- /55/ Sezgin, E., Schwille, P.: *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a009803 (2011)
- /56/ Viola, A., Gupta, N.: *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 889-896 (2007)
- /57/ Man, P., Novak, P., Cebecauer, M., Horvath, O., Fiserova, A., Havlicek, V., Bezouska, K.: *Proteomics* **5**, 113-122 (2005)
- /58/ Foster, L.J., De Hoog, C.L., Mann, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5813-5818 (2003)
- /59/ Otahal, P., Angelisova, P., Hrdinka, M., Brdicka, T., Novak, P., Drbal, K., Horejsi, V.: *J. Immunol.* **184**, 3689-3696 (2010)
- /60/ Brugger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F.T., Krausslich, H.G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 2641-2646 (2006)
- /61/ Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., Simons, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5795-5800 (2003)
- /62/ Magee, A.I., Parmryd, I.: *Genome Biol.* **4**, 234 (2003)
- /63/ Smart, E.J., Ying, Y.S., Mineo, C., Anderson, R.G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 10104-10108 (1995)
- /64/ Pike, L.J., Han, X., Gross, R.W.: *J. Biol. Chem.* **280**, 26796-26804 (2005)
- /65/ Aebersold, R., Goodlett, D.R.: *Chem. Rev.* **101**, 269-295 (2001)
- /66/ Mann, M., Hendrickson, R.C., Pandey, A.: *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 437-473 (2001)
- /67/ Whitehouse, C.M., Dreyer, R.N., Yamashita, M., Fenn, J.B.: *Anal. Chem.* **57**, 675-679 (1985)
- /68/ Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, 151-153 (1988)

- /69/ Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F.: *Int. J. Mass Spec. Ion Proc.* 78, 53-68 (1987)
- /70/ Karas, M., Bachmann, D., Hillenkamp, F.: *Anal. Chem.* 57, 2935-2939 (1985)
- /71/ Aebersold, R., Mann, M.: *Nature* 422, 198-207 (2003)
- /72/ Bruker Daltonics Inc.: *Technical Note #TN-12: Innovative smartbeam Laser Technology Enhances MALDI-TOF Based Proteomics Applications*, dostupné dne 13.4. z <http://www.bdal.com/uploads/media/TN-12-smartbeam.pdf>
- /73/ Doroshenko, V.M., Cotter, R.J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 992-999 (1999)
- /74/ Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., Holle, A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 952-965 (2003)
- /75/ Spengler, B.: *J Mass Spectrom* 32, 1019-1036 (1997)
- /76/ Wysocki, V.H., Resing, K.A., Zhang, Q., Cheng, G.: *Methods* 35, 211-222 (2005)
- /77/ Johnson, R.S., Martin, S.A., Biemann, K., Stults, J.T., Watson, J.T.: *Anal. Chem.* 59, 2621-2625 (1987)
- /78/ Johnson, R.S., Martin, S.A., Biemann, K.: *Int. J. Mass Spec. Ion Proc.* 86, 137-154 (1988)
- /79/ Matrix Science Ltd.: *Mascot algorithm*, dostupné dne 13.4.2012 z <http://www.matrixscience.com>
- /80/ Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M., Yates, J.R., 3rd: *Nat. Biotechnol.* 17, 676-682 (1999)
- /81/ Loo, J.A., Edmonds, C.G., Smith, R.D.: *Science* 248, 201-204 (1990)
- /82/ Balgley, B.M., Laudeman, T., Yang, L., Song, T., Lee, C.S.: *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1599-1608 (2007)
- /83/ Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S.: *Electrophoresis* 20, 3551-3567 (1999)
- /84/ Magrane, M., UniProt-Consortium: *Database (Oxford)* 2011, bar009 (2011)
- /85/ Eng, J.K., Searle, B.C., Clauser, K.R., Tabb, D.L.: *Mol. Cell. Proteomics* 10, R111 009522 (2011)
- /86/ Pappin, D.J., Hojrup, P., Bleasby, A.J.: *Curr. Biol.* 3, 327-332 (1993)
- /87/ Kall, L., Storey, J.D., MacCoss, M.J., Noble, W.S.: *J. Proteome Res.* 7, 40-44 (2008)
- /88/ Elias, J.E., Haas, W., Faherty, B.K., Gygi, S.P.: *Nat. Methods* 2, 667-675 (2005)
- /89/ Elias, J.E., Gygi, S.P.: *Nat. Methods* 4, 207-214 (2007)
- /90/ Boyum, A.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest., Suppl.* 21, 77-89 (1968)
- /91/ Sambrook, J., Russell, D.W.: *Molecular Cloning - a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001)
- /92/ Rey, M., Mrazek, H., Pompach, P., Novak, P., Pelosi, L., Brandolin, G., Forest, E., Havlicek, V., Man, P.: *Anal. Chem.* 82, 5107-5116 (2010)
- /93/ Tzur, A., Moore, J.K., Jorgensen, P., Shapiro, H.M., Kirschner, M.W.: *PloS one* 6, e16053 (2011)
- /94/ Sigma-Aldrich Co., LLC: *Syringe Needle Gauge Chart*, dostupné dne 2.5.2012 z <http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/stockroom-reagents/learning-center/technical-library/needle-gauge-chart.html>
- /95/ Keller, B.O., Sui, J., Young, A.B., Whittall, R.M.: *Anal. Chim. Acta* 627, 71-81 (2008)
- /96/ Pompach, P.: Identifikace proteinů membránových mikrodomén hmotnostní spektrometrií: *Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie* (2002)
- /97/ EXBIO Praha: *Monoclonal Antibody to alpha-tubulin - product datasheet*, dostupné dne 1.5.2012 z http://www.exbio.cz/pdf/data_sheet_new.py/CLO000000000000147/1/1/datasheet-11-250-C100.pdf
- /98/ Moser, T.L., Kenan, D.J., Ashley, T.A., Roy, J.A., Goodman, M.D., Misra, U.K., Cheek, D.J., Pizzo, S.V.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6656-6661 (2001)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka